

**DAS ANGIOTENSIN I - CONVERTING ENZYME
EIN BEITRAG ZUR EXISTENZ VON ISOENZYMEN
IM MENSCHLICHEN SERUM UND AKTIVITÄTSMESSUNGEN
IM SERUM VON PATIENTEN**

PAMELA DAHLHEIM

1986

Aus der Pneumologischen Abteilung in der Medizinischen
Klinik I im Klinikum Großhadern der Universität München

Direktor der Klinik: Prof. Dr.
Pneumolog. Abt.: Prof.

Das Angiotensin I - Converting Enzyme

Ein Beitrag zur Existenz von Isoenzymen im
menschlichen Serum und

Aktivitätsmessungen im Serum von Patienten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Pamela Dahlheim

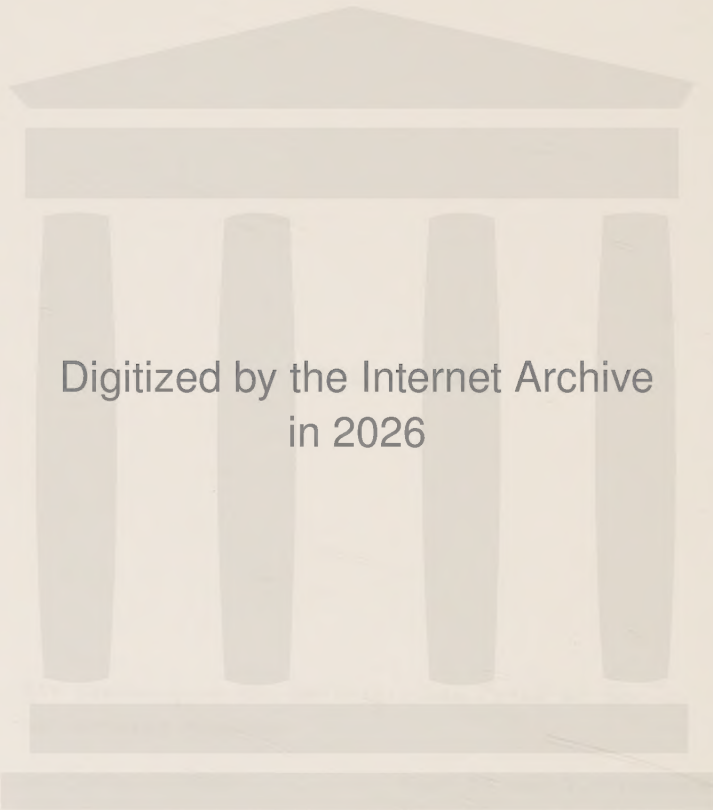
aus Hannover

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München:

Berichterstatter:	Prof.Dr.med.G. Fruhmann
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.med.G. Riecker
Dekan:	Prof.Dr.med.W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.1986	

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554609_0023

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

- 1.1. Das Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)
Historische Entwicklung des Erkenntnisstandes
- 1.2. Das ACE als Komponente des Renin-Angiotensin-
Systems (RAS)
- 1.3. Die Verteilung des ACE im Organismus
- 1.4. Das Krankheitsbild der Sarkoidose
 - 1.4.1. Definition
 - 1.4.2. Epidemiologie
 - 1.4.3. Pathologie
 - 1.4.4. Klinik und Diagnostik
 - 1.4.5. Zur Therapie
- 1.5. Problemstellung

2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1. Methoden zur Bestimmung der ACE-Aktivität
 - 2.1.1. Spektralphotometrische Methode nach Cushman und Cheung
 - 2.1.2. Fluorimetrische Methode nach Piquilloud,
Reinharz und Roth
 - 2.1.3. Radiochemische Methode
 - 2.1.4. Weitere Nachweismöglichkeiten
 - 2.1.4.1. Radioimmunologische Verfahren
 - 2.1.4.2. Gefäßstreifenmethode nach Helmar
 - 2.1.5. Vergleich von drei Methoden zur Aktivitätsbestimmung
des ACE im menschlichen Serum
 - 2.1.6. Untersuchungen über das Stabilitätsverhalten des
Serum-ACE während der Aufbewahrung im gefrorenen
Zustand (-18°C)

- 2.2. Differenzierung von Isoenzymen des ACE im menschlichen Serum durch Sephadex-Gelchromatographie (Molekulargewichtsbestimmung)
- 2.2.1. Prinzip der Gelchromatographie
- 2.2.2. Eichung des Sephadex-Gels G-200
- 2.2.3. Auftrennung der Proteine menschlicher Seren an dem Gel Sephadex G-200
- 2.3. Patientengut
- 2.4. Statistische Methoden
- 3. ERGEBNISSE
- 3.1. Vergleich von drei Methoden zur Aktivitätsbestimmung des ACE im menschlichen Serum
- 3.2. Untersuchungen über Stabilität des Serum-ACE und die Meßgenauigkeit (Interassay- und Intra-assayvariationskoeffizienten) der Lieberman-Methode
- 3.2.1. Stabilitätsverhalten des Serum-ACE während der Aufbewahrung im gefrorenen Zustand (-18°C)
- 3.2.2. Interassayvariationskoeffizient der Endwerte
- 3.2.3. Interassayvariationskoeffizienten der Zwischenwerte (Meß- und Leerwerte)
- 3.2.4. Intraassayvariationskoeffizienten der Meßwerte
- 3.2.5. Streubreite der Leerwerte
- 3.2.6. Überprüfung der Meßwerte auf Normalverteilung nach Gauß
- 3.3. Meßergebnisse der ACE-Aktivitätsbestimmung im Serum der Patienten
- 3.3.1. Normalbereich der ACE-Aktivität im menschlichen Serum
- 3.3.1.1. Gemittelte Serum-ACE-Aktivitäten der Patienten mit Enzymwerten im Normalbereich ($7,64 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 2 \text{ SD}$)
- 3.3.1.2. Mittelwert der Serum-ACE-Aktivitäten aller Patienten

- 3.3.2. Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitäten
 - 3.3.2.1. Gesamtes Patientengut
 - 3.3.2.2. Einteilung in Männer und Frauen
- 3.3.3. Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten
 - 3.3.3.1. Gesamtes Patientenkollektiv
 - 3.3.3.2. Einteilung in Männer und Frauen
- 3.3.4. Mittlere Enzymaktivität
 - 3.3.4.1. In Abhängigkeit vom Lebensalter
 - 3.3.4.2. In Abhängigkeit vom Geschlecht
 - 3.3.4.3. In Abhängigkeit von der Zeit der Messung (Jahreszeit- bzw. Witterungseinflüsse)
- 3.3.5. In vitro-Hemmung der Serum-ACE-Aktivität mit dem ACE-Inhibitor MK 422
 - 3.3.5.1. Mittelwerte der prozentualen in vitro-Hemmung
 - 3.3.5.2. Prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Höhe der Serum-ACE-Aktivität
- 3.4. Auftrennung der Serum-ACE-Aktivität mit Hilfe der Sephadex-Säulenchromatographie
 - 3.4.1. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität (Aktivitätsspektren) gesunder Probanden
 - 3.4.2. Molekulargewichtsbereiche der Serum-Enzyme gesunder Probanden
 - 3.4.3. Aktivitätsmittelwerte der Einzelbanden
- 3.5. Elutionsprofile (Aktivitätsspektren) und Molekulargewichtsbereiche der Serum-ACE-Aktivität anephrischer Patienten
- 4. DISKUSSION
 - 4.1. Vergleich von drei Methoden zur Aktivitätsbestimmung des ACE im menschlichen Serum
 - 4.2. Untersuchungen über Stabilität des Serum-ACE und die Meßgenauigkeit (Interassay- und Intra-assayvariationskoeffizienten) der Lieberman-Methode
 - 4.2.1. Stabilitätsverhalten des Serum-ACE während der Aufbewahrung im gefrorenen Zustand (-18° C)

- 4.2.2. Interassayvariationskoeffizient der Endwerte
- 4.2.3. Interassayvariationskoeffizienten der Zwischenwerte (Meß- und Leerwerte)
- 4.2.4. Intraassayvariationskoeffizient der Meßwerte
- 4.2.5. Streubreite der Leerwerte
- 4.2.6. Überprüfung der Meßwerte auf Normalverteilung nach Gauß
- 4.2.7. Korrekturfaktor
- 4.3. Meßergebnisse der ACE-Aktivitätsbestimmung im Serum der Patienten
 - 4.3.1. Normalbereich der ACE-Aktivität im menschlichen Serum
 - 4.3.1.1. Gemittelte Serum-ACE-Aktivität der Patienten mit Enzymwerten im Normalbereich ($7,64 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 2 \text{ SD}$)
 - 4.3.1.2. Mittelwert der Serum-ACE-Aktivitäten aller Patienten
 - 4.3.2. Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitäten
 - 4.3.2.1. Gesamtes Patientengut
 - 4.3.2.2. Einteilung in Männer und Frauen
 - 4.3.3. Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten
 - 4.3.3.1. Gesamtes Patientenkollektiv
 - 4.3.4. Mittlere Enzymaktivität
 - 4.3.4.1. In Abhängigkeit vom Lebensalter
 - 4.3.4.2. In Abhängigkeit vom Geschlecht
 - 4.3.4.3. In Abhängigkeit von der Zeit der Messung (Jahreszeit- bzw. Witterungseinflüsse)
 - 4.3.5. In vitro-Hemmung der Serum-ACE-Aktivität mit dem ACE-Inhibitor MK 422
 - 4.3.5.1. Mittelwerte der prozentualen in vitro-Hemmung
 - 4.3.5.2. Prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Höhe der Serum-ACE-Aktivität
 - 4.3.6. Das Verhalten der Serum-ACE-Aktivitäten einzelner Patienten während der Behandlung
 - Kontrolle des Therapieverlaufs -

- 4.4. Auftrennung der Serum-ACE-Aktivität mit Hilfe
 der Sephadex-Säulen-Chromatographie
- 4.4.1. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität
 (Aktivitätsspektren) gesunder Probanden
- 4.4.2. Molekulargewichtsbereiche der Serum-Enzyme
 gesunder Probanden
- 4.4.3. Geschlechtsunterschiede der Elutionsprofile
 bzw. Molekulargewichtsbereiche
- 4.4.4. Aktivitätsmittelwerte der Einzelbanden
- 4.5. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität
 (Aktivitätsspektren) anephrischer Patienten

- 5. ZUSAMMENFASSUNG
- 6. LITERATURVERZEICHNIS
- 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
- 8. LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

1.1. Das Angiotensin I-Converting Enzyme

- Historische Entwicklung des Erkenntnisstandes -

Das Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) ist eine Dipeptidylcarboxypeptidase (E.C. 3.4.15.1), die die Umsetzung des Dekapeptids Angiotensin I (A I) in das Angiotensin II (A II) unter Abspaltung des Dipeptids His-Leu katalysiert. Das Octapeptid A II ist die stärkste bisher bekannte vasokonstriktorisch wirksame Substanz. Dem ACE werden außerdem weitere physiologische Wirkungen zugeschrieben. Es vermag auch Bradykinin, Enkephalin, Insulin, Substance P usw. als Enzymsubstrat umzusetzen (11).

Obwohl die erste Komponente des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), das Renin, schon Ende des letzten Jahrhunderts von Tigerstedt und Bergman (1898) entdeckt wurde (158), konnte die Existenz eines ACE erst 50 Jahre später von I.H. Page postuliert werden. Dieser Autor vermutete, daß eine Substanz, die er "angiotonin activator" nannte, für die Bildung der vasoaktiv wirksamen Komponente des RAS notwendig sei (94). L.T. Skeggs und Mitarbeitern gelang es 1954, die Angiotensine I und II mit Hilfe der Gegenstrom-Verteilungs-Technik voneinander abzutrennen (139). Die Autoren nahmen an, daß eines dieser beiden Peptide durch Einwirkung des Renins und daß das andere unter Mitwirkung eines Plasmaenzyms gebildet wird, das Halogenid- oder Nitrationen für seine Aktivierung benötigt. Skeggs und Mitarbeiter nannten diese Peptide, wie später auch Braun-Menendez (18) "Hypertensine" und nahmen an, daß beide Substanzen physiologisch wirksam seien. Die Arbeitsgruppe Skeggs gab ferner an, daß das Enzym, das die Umwandlung von Hypertensin I in II katalysiert, nicht dialysierbar ist. Sie konnten das Vorhandensein dieses Enzyms im Serum des Menschen und auch des Pferdes nachweisen (140). Erst von O. Helmer wurde 1957 er-

kannt, daß nur dem Hypertensin II (Angiotensin II) eine vasoaktive Wirkung zukommt. Dieses stellte er mit Hilfe der Gefäßstreifentechnik unter Verwendung eines Aortenpräparates fest (54, 140). Die Blutdruckwirksamkeit von venös appliziertem A I wurde von Skeggs später dadurch erklärt, daß er im Plasma eine schnelle Convertierung zu A II annahm. Seine Arbeitsgruppe entwickelte daraufhin ein Verfahren zur Reinigung des Plasmaenzyms, das die A II-Bildung katalysiert. Die Anreicherung erfolgte mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und einer anschließenden isoelektrischen Präzipitierung. Gleichzeitig beschrieben Skeggs et al eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität (140). Lentz und Mitarbeiter zeigten 1956 erstmals, daß ACE das Dipeptid His-Leu von der benachbarten Carboxygruppe der Aminosäure Phenylalanin abspaltet (72).

Page und Bumpus fanden heraus, daß das ACE nicht nur im Plasma, sondern auch in Geweben vorkommt (95). Sie wiesen Enzymaktivitäten nach in Homogenaten von Herz, Leber, Aorta und Ileum. Genauere Untersuchungen über die Verteilung der spezifischen ACE-Aktivität wurden von Roth et al (124), Cushman und Cheung (26, 28) und in neuerer Zeit von Schweisfurth (147), Pschorr (105) und van Sande (127) durchgeführt.

Ng und Vane nahmen an, daß A I zum größten Teil in der Lunge convertiert wird. Zur Erklärung gaben sie mehrere Hypothesen an:

Sie vermuteten, daß die Aktivität des ACE vom Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidgehalt des Blutes beeinflusst oder von der Oberfläche der Lungengefäße aktiviert wird. Als weitere Denkmöglichkeit wurde eine Lokalisation des ACE im Lungengewebe angenommen (87, 88). Dieselben Autoren untersuchten die Angiotensin-Convertierung an isolierten Organen. Sie perfundierten Nieren und Lungen mit blutfreien Lösungen, die A I enthielten und analysierten die Peptidkonzentra-

tionen mit Hilfe isolierter Magen- oder Colonstreifen. Sie fanden heraus, daß die Angiotensin-Convertierung nur dann auftritt, wenn die Lösungen zuvor den Lungenkreislauf passiert hatten. Nach alleiniger Nierenpassage konnte keine wesentliche A II-Bildung nachgewiesen werden. Deswegen wurde von diesen Autoren eine intrarenale A II-Bildung in Frage gestellt. Jedoch berichteten Thureau et al 1969 über die Lokalisation des ACE im glomerulären Bereich (154, 155, 156, 157). Dieser Befund wurde 1982 von Taugner und Hackenthal bestätigt (52). Thureau und Mitarbeiter verwendeten mikrodissezierte, vom Blut befreite Glomeruli der Ratte und inkubierten diese mit angereichertem Ratten-Renin-Substrat oder A I. Mit Hilfe der Aortenstreifenmethode ermittelten sie, daß es ACE oder ein anderes A II-bildendes Enzym im glomerulären Gewebe gibt. Die Autoren beobachteten, daß die glomeruläre A II-Bildung besser bei dem pH 6,5 als 8,0, dem pH-Optimum des Plasma-ACE erfolgt. Später charakterisierten Schweisfurth et al das glomeruläre Enzym und bewiesen, daß es sich dabei um ein Iso-ACE handelt (147, 148). 1974 wurde auch von Vane die Existenz eines intrarenalen RAS neben dem peripheren nicht mehr ausgeschlossen (172). Weitere biochemische Eigenschaften des ACE, besonders des der Kaninchen- und Hundelungen, wurden 1968 von Bakhle beschrieben, der die Enzymaktivität biologisch (Bioassay) bestimmte (5, 6). Es gelang ihm, durch eine Differentialzentrifugation ACE von anderen Peptidasen abzutrennen. Er beobachtete, daß das Lungen-ACE in einem Sediment enthalten ist, während die anderen Peptidasen im Überstand gelöst nachweisbar sind, so daß er das ACE als membrangebundenes Enzym beschrieb. Bakhle erkannte bereits, daß der sog. "Bradykinin Potentiating Factor" (BPF), ein Peptid, das im giftigen Sekret der *Bothrops jararaca* venom vorkommt, als Inhibitor des ACE wirksam ist. Diese Beobachtung war der Anfang der Untersuchungen, die zum Ziel hatten, durch Hemmung des ACE

den Blutdruck von Hypertonikern zu senken. Im Jahre 1970 gelang es Ferreira et al die Aminosäuresequenz des BPF zu bestimmen (44). Das synthetisch hergestellte Nonaeptid BPF (SQ 20881) konnte bereits in klinischen Studien zur Therapie von arteriellen Hypertonien unterschiedlicher Genese eingesetzt werden (36). Nachteilig für die klinische Anwendung dieser Substanz war, daß sie als Peptid nicht oral verabreicht werden kann. Cushman et al gelang es, eine oral applizierbare Substanz zu synthetisieren, SQ 14225 oder auch Captopril genannt, die sich außerdem wirksamer als SQ 20881 erwies (92). In den letzten Jahren wurden von mehreren Firmen weitere und verbesserte ACE-Blocker entwickelt. Klinische Studien mit diesen Inhibitoren und auch mit Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten erbrachten neue Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung des RAS (36). Unerwartet führte die Applikation von ACE-Inhibitoren oder Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten zu einer Blutdrucksenkung bei Patienten mit essentieller Hypertonie und bei normotensiven Probanden (36).

Einen weiteren Fortschritt erbrachte die Entwicklung von Methoden zur quantitativen Messung der ACE-Aktivität. Diese ermöglichten eine weitere biochemische Charakterisierung des Enzyms.

M. Roth und Mitarbeiter synthetisierten Substanzen, die endständig das Dipeptid His-Leu enthielten und als Enzymsubstrat für das ACE eingesetzt werden konnten. Besonders Benzyloxycarbonyl-Phenyl-Histidyl-L-Leucin (Z-Phe-His-Leu) erwies sich als gut geeignet für die fluorimetrische Messung der ACE-Aktivität, insbesondere für kleine Enzymaktivitäten (100).

Im Jahre 1971 wurde von Cushman und Cheung (27) eine häufig verwendete spektralphotometrische Technik zur Bestimmung der ACE-Aktivität veröffentlicht. Diese Autoren benutzten Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (Hip-His-Leu) als synthetisches Enzymsubstrat.

Von großer klinischer Bedeutung ist die Messung von Serum-ACE-Aktivitäten bei der Diagnosesicherung und Therapiekontrolle der Sarkoidose. Bei klinischen Screening-Messungen stellte sich heraus, daß signifikant erniedrigte ACE-Serum-Aktivitäten bei Karzinomen des Bronchialtraktes, aber auch anderer Organe auftreten (148). Über die pathophysiologischen Hintergründe dieses Phänomens läßt sich bislang wenig sagen.

R. Boucher entdeckte als erster ein Isoenzym des ACE, das v.a. in den Speicheldrüsen, aber auch in anderen Organen vorkommt (16, 17). Dieses Enzym wurde B-ACE oder auch Tonin genannt und kann sowohl A I als auch direkt Angiotensinogen zu A II umsetzen.

1980 wurde von Schweisfurth in der Nierenrinde der Ratte ein weiteres Isoenzym gefunden (29). Dieses Enzym ließ sich nicht durch Converting-Enzyme-Inhibitoren hemmen. Sein pH-Optimum liegt bei 6,5 und unterscheidet sich deutlich von dem des Plasma-ACE. Diesem Enzym kommt wahrscheinlich für die juxtaglomeruläre A II-Bildung eine Bedeutung zu. Neuerdings wird von Erdös und Mitarbeitern eine Endopeptidase beschrieben, die hauptsächlich in der Niere vorkommt und möglicherweise mit dem vorhergenannten Isoenzym identisch ist (39). Da auch Renin in verschiedenen Geweben des Organismus nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob mehrere lokale Renin-Angiotensin-Systeme existieren.

1.2. Das ACE als Komponente des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Isoenzymen des RAS beschrieben, so daß die chemischen Zusammenhänge, die zur A II-Bildung führen, weitaus komplizierter sind als früher beschrieben wurde. Wird angenommen, daß die A II-Bildung hauptsächlich im Plasma erfolgt, so könnte allen diesen Komponenten, soweit sie auch im Plasma enthalten sind, Bedeutung zukommen. In Abbildung 1 sind die chemischen

Zusammenhänge der A II-Bildung schematisch dargestellt.

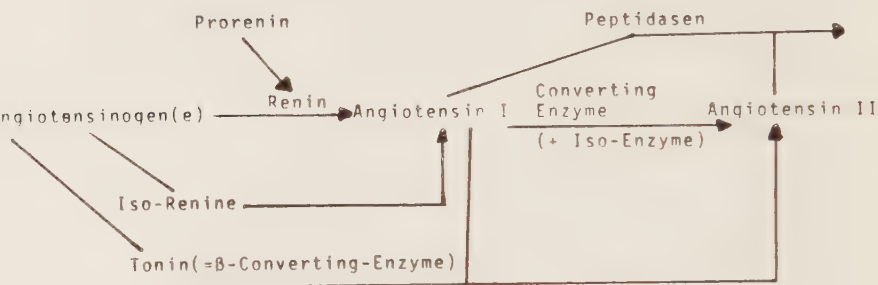


Abb. 1 Erweitertes Renin-Angiotensin-System (12)

Das Enzym Renin wird hauptsächlich in den epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates, die sich in der Media der afferenten glomerulären Arteriole befinden, gebildet und von dort sowohl ins Blutplasma als auch in den perivaskulären Raum freigesetzt (7, 83). Renin wird aus einer Vorstufe, dem Prorenin und dieses aus dem Präprorenin gebildet (12). Die im Plasma enthaltene Vorstufe des Renins ist aktivierbar, z.B. durch Kälte, Ansäuerung oder auf enzymatischem Wege. Über die genauen Mechanismen der Reninaktivierung ist bislang recht wenig bekannt. Ebenso ist unklar, auf welchem Wege das Renin aus der Blutbahn eliminiert wird. Es wird angenommen, daß das Enzym teilweise glomerulär filtriert und renal abgebaut wird (32). Auch die Leber ist am Katabolismus des Renins beteiligt (146). Im Endharn können nur sehr kleine Reninaktivitäten nachgewiesen werden (32).

In einer Reihe von Organen wurden Renin oder reninähnliche Enzyme, die insgesamt als Angiotensin I-bildende Angiotensinogenasen bezeichnet werden können, gebildet. Recht früh ist das Vorkommen solcher Enzyme in der Speicheldrüse der Maus und der Ratte (24, 165) und im Uterus nachgewiesen worden. Auch in Teilen des Gehirns, der Nebenniere und in Gefäßwänden konnten Enzymaktivitäten festgestellt werden (3, 21). Diese Enzyme reagieren mit dem im Plasma enthaltenen, von der Leber synthetisierten Angiotensinogen, einem Glykoprotein der α_2 -Globulinfraktion, dessen Molekulargewicht etwa 45 000 beträgt unter Bildung des Dekapeptids A II. Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß im Plasma mindestens zwei Reninsubstrate mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften enthalten sind (69, 85). Ob beide Proteine von der Leber synthetisiert werden und in gleicher Weise mit den A I-bildenden Enzymen reagieren, ist bisher nicht bekannt (85, 109).

Im Plasma ist, insbesondere beim Menschen, das Angiotensinogen in so hoher Konzentration enthalten, daß man davon ausgehen kann, daß Enzymsubstratsättigung vorliegt, und eine nicht zu große Veränderung der Angiotensinogenkonzentration also keine Wirkung auf die A I-Bildung hat (109). Ob diese Annahme für postulierte lokale Gewebesysteme ebenfalls zutrifft, ist noch nicht bekannt. Mechanismen der Angiotensinogenbildung und Freisetzung sind ebenfalls weitgehend unbekannt. Das im Plasma oder im Gewebe enthaltene A I wird durch das ACE oder seine Isoenzyme in A II umgesetzt oder aber gleich abgebaut. Ob Abbauprodukte dieser Reaktionen neben dem A II biochemisch oder physiologisch wirksam werden können, wird gegenwärtig von mehreren Arbeitsgruppen untersucht.

Recht wenig ist bisher über den direkten A I-Abbau bekannt. Es kann angenommen werden, daß durch diese Reaktion bezweckt wird, A I, das nicht sofort in A II umgesetzt wird, aus der Blutbahn zu entfernen. Allgemein wird vermutet, daß die A I-Freisetzung der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende

Schritt bei der A II-Bildung ist. Dieses wurde für das Plasmasystem nachgewiesen (19). Es ist nicht bewiesen, daß diese Annahme auch für die im Gewebe erfolgende Angiotensinbildung zutrifft.

In der Niere z.B., dem hauptsächlichlichen Syntheseort des Renins, könnte dem ACE eher eine kontrollierende Funktion zukommen. In diesem Organ ist es auch möglich, daß die Renin-substratkonzentration an der Kontrolle der A I-Bildung beteiligt ist. In den Geweben, in denen ACE in hohen Aktivitäten enthalten ist, z.B. in der Lunge oder im männlichen Genitaltrakt, sollte dem ACE keine regulierende Funktion zukommen. Da in der Niere neuerdings auch sehr hohe ACE-Aktivitäten nachgewiesen wurden (37, 149), ist die Frage, in welchem Maße die beteiligten Teilreaktionen die A II-Bildung beeinflussen, weitgehend ungelöst.

Es ist jedoch denkbar, daß den angiotensinabbauenden Peptidasen (Angiotensinasen) Bedeutung für die A I-Bildung zukommt. In vitro kann eine Angiotensin-Bildung nur nachgewiesen werden, nachdem die Angiotensinasen ausreichend gehemmt worden sind. Da heute für fast alle dem RAS zugehörenden enzymatischen Komponenten physiologische oder pathophysiologische Bedingungen bekannt sind, die zu einer Veränderung ihrer Aktivitäten führen können, kann man annehmen, daß die A-II-Bildung durch alle beteiligten Parameter kontrolliert wird. Eine potenzierte A II-Bildung würde dann auftreten, wenn A I- und A II-Bildungen stimuliert und Angiotensinabbau supprimiert werden. Dieses wurde bei einer experimentell durchgeführten renalen Ischämie von Schweisfurth (147) beobachtet. Bereits H. Goldblatt hat darauf hingewiesen (48), daß bei experimentellen Hypertonien die Aktivität angiotensin-abbauender Enzyme vermindert ist.

1.3. Die Verteilung des ACE im Organismus

Die ersten systematisch durchgeführten Untersuchungen über

die Verteilung der spezifischen Converting-Enzyme-Aktivität im Organismus wurden von M. Roth und Mitarbeitern (124) sowie von Cushman und Cheung (26,28) durchgeführt. Übereinstimmend wurden von beiden Arbeitsgruppen die höchsten ACE-Gehalte in der Lunge und sehr niedrige in der Niere bestimmt. Noch höhere ACE-Aktivitäten konnten Cushman und Cheung im Hoden und Nebenhoden und M. Roth später im Seminalplasma nachweisen (123). Neuere Untersuchungen zeigten, daß in der Niere weitaus höhere Enzymspiegel enthalten sind, als ehe-
dem angenommen wurde. Diese Befunde wurden sowohl von Erdös (37, 39) als auch von Schweisfurth (149) und Pschorr (105) erhoben. Van Sande fand kürzlich maximale Aktivitäten in der normalen menschlichen Prostata und besonders in der hypertrophierten (127). Tabelle 1 gibt die von Roth, Cushman und Pschorr gefundenen spezifischen Aktivitäten für die Ratte und die von van Sande für den Menschen ermittelten Werte wieder.

Allgemein ist ACE in vaskulären Endothelzellen enthalten, und es wird als Markerenzym dieser Zellen angesehen. In glatten Muskelzellen von arteriellen Gefäßen wurde ACE von mehreren Arbeitsgruppen identifiziert (70, 90). Auch in den myoepithelialen juxtaglomerulären Zellen, in denen das renale Renin synthetisiert wird, konnte ACE gefunden werden (58). Über die Verteilung dieses Enzyms im Gehirn geben die folgenden Tabellen 2 und 3 nach Poth (103) und Weindl (164) Auskunft.

Gewebe	M.Roth (124)	Cushman (26)	Pschorr (105)	v.Sande (127)
	ACEA	ACEA	ACEA	ACEA
	(mU/mg Protein)	(mU/mg Protein)	(nmol/ml . min/0,2g Gewebe)	(U/gProtein)
Epididymis		122	66,8	
Hoden		85	31,1	
Lunge	37,2	48	26,6	125
Duodenum		8,6		
Pankreas		7,4		
Jejunum		6,0		
Ovar		3,4	2,3	120
Ileum	4,67	3,3		567
Aorta		2,9	1,6	
Magen	2,18	2,7		15
Uterus		2,2	0,5	
Samenblase		2,0		300
Thymus		1,9		
Serum	1,03	1,6	11,0	
Gehirn	1,47	1,5		
Colon		1,2		50
Milz	0,9	0,9		360
Niere	0,63	0,6	2,5	365
Herz	0,15	0,5		
Muskel	0,71	0,2		
Leber		0,2		55
Appendix				824
Prostata				395
Prostatasekret				160

Tab. 1 Verteilung der spezifischen ACE-Aktivität im Organismus

Gehirnteil	ACEA $\frac{\text{mol His-Leu} \times 10^{-9}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}}$
Nucleus caudatus	2,48
Septum pellucidum	0,85
Praefrontaler Cortex	0,62
Hypothalamus	0,50
Temporal Cortex	0,49
Amygdala	0,39
Colliculi	0,29
Hippocampus	0,29
Occipitaler Cortex	0,25
Cerebellärer Cortex	0,14

Tab. 2 Verteilung der spezifischen ACE-Aktivität im menschlichen Gehirn (103)

Gehirnteil	ACEA $\mu\text{mol/g} \times \text{h}$
Subfornicales Organ	955
Area postrema	253
Neurophyse	88
Choroid Plexus	64
Adenophyse	22
Cortex	8

Tab. 3 Verteilung der spezifischen ACE-Aktivität im Gehirn der Ratte (164)

1.4. Das Krankheitsbild der Sarkoidose

1.4.1. Definition

Die Sarkoidose, auch bekannt unter den Namen Morbus Boeck, Morbus Boeck-Besnier-Schaumann, Lympho-granulomatosis benigna, Hutchinson'sche Erkrankung, sklerosierende Miliartuberkulose, Pseudotuberkulosis granulomatosa etc., wurde noch vor 30 Jahren wegen der gelegentlich auftretenden Hautmanifestationen als eine, wenn auch recht seltene, dermatologische Erkrankung angesehen (51). Jedoch wurde 1982 in der BRD ihre Häufigkeit mit ca. 30 000 Erkrankten angegeben, und die Inzidenz beträgt in etwa 5 000 - 6 000 Neuzugänge jährlich (171). Es gibt Anzeichen, die für eine Zunahme der Häufigkeit sprechen. Epidemiologisch auffällig ist, daß die zunehmende Häufigkeit der Sarkoidose mit einer abnehmenden der Tuberkulose einhergeht. Diese Angaben mögen die Dringlichkeit der Erforschung der Ätiologie, Diagnose und Therapie dieser anfangs oft symptomlosen Erkrankung hervorheben. Seit Beginn dieses Jahrhunderts wurden in vielen medizinischen Teilgebieten Erkenntnisse über die Erkrankung gesammelt, so daß wir heute recht gut über die klinischen Erscheinungsformen orientiert sind. Als Definition des Krankheitsbildes der Sarkoidose wird von Wurm (171) angegeben:

"Die Sarkoidose ist eine inhalativ ausgelöste systemische Allgemeinerkrankung im Sinne einer Reaktionskrankheit bei genetischer Disposition. Die auslösende exogene Noxe oder eine Mehrzahl von koinzidierenden Noxen sind heute noch unbekannt. Klinisch ist die Sarkoidose durch einen krankheitstypischen Ablauf in Stadien, immunologisch durch eine gestörte Homöostase zwischen zellulärer und humoraler Abwehrreaktion, pathologisch-anatomisch durch das epitheloidzellige Granulom charakterisiert."

Bei der 7. Internationalen Sarkoidose-Konferenz 1976 in New York wurde die Sarkoidose folgendermaßen beschrieben:

"Sarcoidosis is a multisystem granulomatous disorder of unknown etiology most commonly affecting young adults and presenting most frequently with bilateral hilar lymphadenopathy, pulmonary infiltration, skin or eye lesions." (61)

1.4.2. Epidemiologie

Die Sarkoidose ist eine weltweit verbreitete Krankheit, wenngleich die Prävalenzzahlen auffällige geographische Unterschiede aufweisen. So kommt sie in den gemäßigten Zonen häufiger vor als in den Tropen. Abgesehen von Portugal und Griechenland hat die Sarkoidose ihre höchste Häufigkeit in Europa mit einem Maximum in Schweden mit 64 Erkrankten auf 100 000 Einwohner. In außereuropäischen Staaten tritt sie besonders in Japan sowie in den USA mit 5,6 bzw. 7,0 auf 100 000 auf. Die niedrigsten Prävalenzangaben stammen aus Brasilien und Portugal mit 0,2, aus Uruguay mit 0,4, Argentinien mit 1,0 sowie Israel mit 1,6 auf 100 000 Einwohner (40). Die verfügbaren epidemiologischen Daten deuten ein Nord-Süd-Gefälle an und zeigen, daß die Sarkoidose in Industrieländern offensichtlich häufiger als in Entwicklungsländern zu beobachten ist, soweit die Angaben der medizinisch unterversorgten Länder zutreffen. Für die Sarkoidose sind statistisch verwertbare Inzidenzzahlen nur bei jährlichen Röntgenreihenuntersuchungen (RRU) mit mindestens 90%iger Beteiligung zu erzielen (40). Für die Bundesrepublik existieren keine bundesweiten Neuerkrankungsziffern, sondern lediglich Zahlenangaben aus regionalen Untersuchungen. Im Neckarraum stieg die Inzidenzrate zwischen 1962 und 1967 beispielsweise von 3,6 auf 7,2 pro 100 000 Einwohner. Im Rahmen des 9. Durchganges der RRU in Schleswig-Holstein mit einer Gesamtbeteiligung von 67,5 % betrug die Inzidenz 3,9 auf 100 000 mit einem 6,5-fachen Anstieg seit 1961 (78). Die Ergebnisse der RRU bei Soldaten der Deutschen Bundeswehr zwischen 1964 und 1975 ergeben Neuerkrankungsziffern

zwischen 19 und 41 auf 100 000 Untersuchte. Aufgrund der vorliegenden Statistiken sind jährlich in der BRD 6 000 - 8 000 Neuerkrankungen an Sarkoidose zu erwarten. Die Krankenanstalten in Höchenschwand werden seit 1950 als Sarkoidose-Zentrum angesehen. So konnten dort bis 1981 über 13 000 Sarkoidose-Fälle behandelt und statistisch erfaßt werden (40). Folgend sollen die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt wiedergegeben werden:

Das Verhältnis männlicher zu weiblicher Sarkoidose-Patienten betrug 50,05 zu 49,95 und entspricht damit in etwa dem der Gesamtbevölkerung der BRD. James konnte hingegen bei einer weltweiten Sarkoidose-Studie feststellen, daß bei Patienten mit weißer Hautfarbe ein ausgewogenes Geschlechtsverhältnis vorliegt, während bei schwarzen Patienten Frauen doppelt so häufig wie Männer erkranken (61). Der Altersgipfel lag beim Höchenschwander Krankengut für beide Geschlechter zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr. Hauptbefall mit 71,4 der männlichen und 57,4 der weiblichen Patienten betrifft das dritte und vierte Lebensjahrzehnt. Bei Frauen kommt es zu einem zweiten Gipfel im 5. und 6. Dezenium, der mit den Involutionsvorgängen des weiblichen Organismus in diesem Alter in Zusammenhang gebracht wird (40).

Sarkoidose - Zugänge je 100 000 d jeweiligen Altersklasse
(Bundesgebiet ohne Hessen)

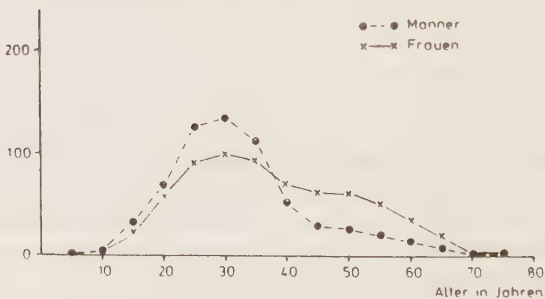


Abb. 2 Sarkoidose-Zugänge (Bundesgebiet ohne Hessen) (40)

Die Sarkoidose zeigt sich somit vornehmlich als Krankheit des jungen Erwachsenenalters.

Die Aufgliederung des Höchenschwander Patientenguts in Berufsgruppen ergab keine berufsbedingten Dispositionen. Ein Überwiegen der Erkrankungszahl bei Personen, die in der Land- und Forstwirtschaft tätig sind, konnte nicht bestätigt werden, wohingegen in der DDR ein gehäuftes Auftreten der Erkrankung in ländlichen Wohngebieten beschrieben wurde. Es wird angenommen, daß sich diese Erscheinung auf einen größeren Inzuchtfaktor auf dem Lande zurückführen läßt (40).

Bis 1975 waren erst 126 Fälle von Familiensarkoidose in der Weltliteratur bekannt (167). Das untersuchte Höchenschwander Krankengut wies zum damaligen Zeitpunkt 130 Patienten auf, bei denen ein oder mehrere Familienmitglieder an Sarkoidose erkrankten. Dabei waren zu 40 % Geschwister, zu 32,2 % Eltern und Kinder und zu 17,7 % unmittelbare Blutsverwandte betroffen. Ehepartner erkrankten nicht signifikant häufiger an Sarkoidose als die Durchschnittsbevölkerung. Bezogen auf ca. 22 Millionen Familien in der BRD ergibt sich bei einer Prävalenz von 23 000 an Sarkoidose Erkrankten eine ca. 20-fach höhere Sarkoidose-Krankheitserwartung für einen Angehörigen einer Sarkoidose-Familie als für Personen aus erkrankungsfreien Familien (40). Über gehäuftes familiäres Auftreten von Sarkoidose wurde auch von anderer Seite berichtet (167).

Man kann davon ausgehen, daß in der Pathogenese der Sarkoidose ein endogener erblicher Faktor eine entscheidende, aber keineswegs ausschließliche Rolle spielt.

1.4.3. Pathologie

Das morphologische Substrat der Sarkoidose ist das im Gegensatz zur Tuberkulose nicht verkäste, rein produktive Epitheloidzell- und Riesenzellgranulom. Dieses Granulom

wurde 1899 zuerst von Boeck an Hautläsionen als "multiple benigne sarcoids of the skin" beschrieben (13). Schaumann bestätigte 1941 die Gutartigkeit und sprach von "Lymphogranuloma benigna" (143).

Durch ihr morphologisch spezifisches Substrat, das Epitheloid- und Riesenzellgranulom wird die Krankheit in die Gruppe der spezifischen Entzündungen wie auch die Tuberkulose, Silikose, Lues, Beryllose etc. eingeordnet.

Aus der von der 7. Internationalen Konferenz über Sarkoidose festgesetzten Definition leitet sich ab, daß die Diagnose dann als höchstwahrscheinlich angesehen werden kann, wenn die klinischen und radiologischen Befunde zusätzlich durch den Nachweis nicht verkäsender Epitheloidzellgranulome gestützt wird (61).

Die Ätiologie der Erkrankung ist unklar. Nach wie vor werden zwei Theorien diskutiert (4, 59):

1. Ein noch nicht definiertes Partikel induziert eine zelluläre Reaktion des Mesenchym-Makrophagensystems, die in einer Granulombildung besteht.
2. Personen mit einer genetisch determinierten, von der Norm abweichenden Reaktion des Immunsystems zeigen unter bestimmten Bedingungen eine Granulombildung.

Die früher hauptsächlich vertretene Ansicht, bei der Sarkoidose handle es sich um eine Tuberkulose mit besonderer Reaktionslage, ist heute allgemein verlassen worden. Die Granulombildung als Folge der Einwirkung anderer Erreger, wie z.B. *Histoplasma capsulatum* und *Coccidioides immitis*, wird nicht mehr diskutiert, weil der Erregernachweis nie gelang (51). Für die Annahme einer durch inhalative Noxen bedingten Granulombildung spricht v.a. die Tatsache, daß trotz des sehr variablen Organbefalls das Lungengerüst zu 60 %, die Bronchusschleimhaut zu 80 % und die Schleimhäute des oberen

Respirationstraktes zu einem nicht unerheblichen Teil beteiligt sind (129). Morphologisch können bis heute keine Aussagen über den Charakter der granulominduzierenden Noxe gemacht werden. Sicher scheint jedoch, daß eine immunologische Prädisposition des mesenchymalen Gewebes als auch des Gesamtorganismus eine Rolle zu spielen scheint. Es werden Fehlfunktionen im Zusammenspiel zwischen B- und T-Lymphozyten diskutiert (60). Experimentell läßt sich zeigen, daß die Induktion einer granulomatösen Reaktion mit Corticoiden unterdrückt werden kann (73).

Histologisch besteht das Epitheloidzellgranulom der Sarkoidose überwiegend aus Epitheloidzellen, Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen vom Langhans-Typ. Diese Zellen sind in der Granulomperipherie pallisadenartig angeordnet, mit wenigen T-Lymphozyten durchsetzt und schließlich von einem schmalen B-Lymphozytensaum umgeben. Charakteristisch ist, daß die zentrale Verkäsung fehlt, weshalb man von einem rein produktiven Granulom spricht. Gelegentlich können kleine zentrale hyaline Nekrosen auftreten, die die histopathologische Differentialdiagnose zur Tuberkulose erschweren (73). Diese hyalinen Nekrosen weisen aber im Gegensatz zur tuberkulösen Verkäsung ein feines Netz von Retikulinfasern auf (64, 118). Das Auftreten hyaliner Nekrosen wird von Uhlinger als Ausdruck einer ausgeprägten Antigen-Antikörper-Reaktion gewertet (161). Das Sarkoidose-Granulom entwickelt sich im retikulo-histiozytären System des Organismus, das in seiner ganz spezifischen Ausrichtung als "mononuclear phagozyte system" (MPS) bezeichnet wird (46). Im MPS entsteht das Granulom zunächst aus einem unspezifischen Infiltrat, bestehend aus polymorphkernigen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Histiocyten in unmittelbarer Umgebung kleiner Gefäße und Kapillaren. Typische Sarkoidosegranulome sind am Schluß ihrer Entwicklung gefäßfrei. Bei fortschreitendem Prozeß bilden sich Ansammlungen von Histiocyten (Epitheloidzellen) aus, die aus eingewanderten

Blutmonozyten entstehen. Granulozyten und Plasmazellen treten zahlenmäßig in den Hintergrund und fehlen schließlich völlig. Dieser Vorgang, d.h. die Umwandlung eines unspezifischen Infiltrates in das spezifische Sarkoidose-Granulom dauert ca. 21 Tage. Verschiedene Granulomentwicklungsphasen können nebeneinander bestehen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß die typischen Epitheloidzellen zum Teil wirkliche Epitheloidzellen, zum Teil Makrophagen sind (46). Beide sollen sich aber aus der gleichen Stammzelle, dem Monozyten, unter Einfluß von Lymphokinen und T-Lymphozyten entwickeln. Die typischen Epitheloidzellen weisen charakteristische Strukturen stoffwechselaktiver, synthetisierender und sekretorischer Zellen auf. Es wird angenommen, daß diese Epitheloidzellen in der Lage sind, spezifische Enzyme, wie z.B. das Angiotensin - I Converting Enzyme zu produzieren (91, 116, 117, 137). Okabe et al konnten in Monozytenkulturen von Sarkoidosepatienten ACE-Aktivität nachweisen. Die Enzymaktivität wurde sowohl in den Monozyten selbst als auch im Kulturmedium gefunden. Monozyten einer gesunden Kontrollgruppe zeigten keine meßbare ACE-Aktivität. Das Monozyten-ACE der Sarkoidosepatienten ließ sich durch Chloridionen aktivieren und durch EDTA, Captopril und ACE-Antikörper vom Kaninchen hemmen (91). Rohrbach konnte zusätzlich zeigen, daß die ACE-Syntheserate der Monozyten in vitro an die Anwesenheit von autologen T-Lymphozyten gebunden ist (116). Makrophagen haben im Unterschied zu den Epitheloidzellen einen höheren Gehalt an Lysosomen, während andere Zellstrukturen geringer ausgebildet sind. In einer Vielzahl von Fällen werden in den mehrkernigen Riesenzellen Einschußkörperchen, sog. Schaumann- oder Asteroid-Körperchen, die 30 µm groß und lamellär aufgebaut sind, gefunden. Dabei handelt es sich um teilweise calcium- und eisenimprägnierte zytoplasmatische Degenerationsprodukte (20, 64). Einschußkörperchen sind für das

Sarkoidose-Granulom nicht spezifisch und wurden auch in Granulomen anderer Genese gefunden (64, 118). Bei länger dauernder Erkrankung bzw. in Abheilungsstadien werden die Granulome konzentrisch von Kollagenfasern umschlossen. In dieser Phase sind zusätzlich Fibroblasten nachweisbar. Die Abheilung kann durch vollständige Vernarbung und Fibrosierung oder durch Resorption des Granuloms mit einer Restitutio ad integrum vonstatten gehen (73). Die Granulome können in allen Organsystemen nachgewiesen werden (43, 107). Voraussetzung für ihre Bildung ist das Vorhandensein des retikuloendothelialen Systems bzw. "mononuclear phagocyte systems". Entsprechend werden die Organsysteme gemäß ihrem MPS-Gehalt unterschiedlich oft befallen. Die einzelnen Häufigkeiten sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

ZNS	5 %
Augen	10 - 30 %
Tränendrüsen	0,5 %
Parotis	6 %
Haut	10 - 20 %
Schleimhäute	1 %
Daniels Lymphknoten	70 %
Periphere Lymphknoten	30 %
Mediastinale Lymphknoten	100 %
Bronchusschleimhaut	80 %
Lungengerüst	60 %
Herz	bis 20 %
Leber	65 %
Milz	20 %
Verdauungstrakt	5 - 10 %
Niere	19 %
Knochen	7 %
Muskulatur	50 %
Narbensarkoidose	1 %
Erythema nodosum	10 - 40 %
Seltene Lokalisationen:	6 %
Genitaltrakt	
Schilddrüse und Nebenschilddrüse	
Hypophyse	
Pankreas	
Nebenniere	

Tab. 4 Sarkoidose-Lokalisationen (129)

1.4.4. Klinik und Diagnostik

Typisch für die Sarkoidose ist eine Diskrepanz zwischen der klinischen Symptomenarmut und der Ausdehnung des Organbefalls. Daher werden viele Fälle zufällig bei einer Röntgenthoraxaufnahme erkannt. In anderen Fällen weisen extrapulmonale Lokalisationen auf die Erkrankung hin (51):

Die Hautsarkoidosen sind vielgestaltig. Man beobachtet einen Lupus pernio, Plaques, Papeln, groß- und kleinknotige Infiltrationen. Hauptsächlich betroffen sind die Areale um Nase, Augen und Mund, alte Narben, Tätowierungen und frische Hautverletzungen (60). Die Schleimhäute sind oft infiltrativ mitbefallen. Alopie kommt bei Beteiligung der Kopfhaut vor.

Die Augensarkoidose äußert sich meist in Form einer Iridozyklitis, Uveitis, Beteiligung der Tränendrüsen mit resultierendem Sicca-Syndrom, Kalkablagerungen in Horn- und Bindehaut. Die Veränderungen im Augeninneren begünstigen die Ausbildung von Katarakt und Glaukom. Eine sekundäre Erblindung ist möglich (110). Ein- oder beidseitiger Exophthalmus wurde bei einigen Patienten beobachtet. Selten kommt es zu retinaler Beteiligung als Folge lokaler Vaskulitiden, Papillitiden und Periphlebitiden (60).

Die Parotissarkoidose bietet das Bild des Febris uveoparotidea bzw. des Heerfordt'schen Syndroms (110).

Die Skelettsarkoidose geht von einer Granulomatose des Knochenmarks aus. Sie ist in der Regel eine Spätmanifestation der chronischen Verlaufsform mit zystischen, gitterförmigen und destruktiven Veränderungen (76). Sie bevorzugt die kurzen Röhrenknochen der Finger und Zehen, ist selten in den Wirbelkörpern, der Schädelkalotte und im Becken lokalisiert (161). Gewöhnlich sind die über den Knochendefekten liegenden Hauptpartien mitbefallen.

Die neurologischen Symptome bei Beteiligung des Nervensystems sind vielfältig. Die Hirn- und peripheren Nerven werden

entweder direkt angegriffen oder es erfolgt eine Infiltration über die Nervenwurzeln oder das umgebende Nervenscheidewebe. Facialisparesen können ein- oder beidseitig auftreten und sind oft erstes Symptom der neuronalen Sarkoidose. Die granulomatöse Basilar meningitis führt zu einer Liquorpleozytose und zu einem Anstieg der Proteinkonzentration in der Spinalflüssigkeit. Bei schweren Krankheitsverläufen wurden auch hirnnorganisch begründete Psychosen beobachtet (101, 62).

Die Beteiligung des Herzens erfolgt in der Regel als Folge der Lungenerkrankung durch pulmonale Hypertonie oder chronisches Cor pulmonale. Der primäre Herzbefall ist äußerst selten und geht in der Regel mit Überleitungsstörungen, paroxysmalen Arrhythmien und infiltrativen Cardiomyopathien einher. Die Prognose verschlechtert sich bei Herzbefall erheblich (104).

Auch die primäre Nierensarkoidose ist äußerst selten. Die Schädigung der Nieren im Verlauf der Sarkoidose erfolgt in erster Linie durch Hypercalcämie und Hyperuricämie. Nephrocalcinose und Nephrolithiasis werden als Folge beobachtet. Bei entsprechender Einschränkung der Nierenfunktionsleistung verschlechtert sich die Prognose nicht unerheblich (60). Die mediastinalen und hilären Lymphknoten sind immer befallen. Selten verspüren die Patienten ein substernales Druckgefühl. Eine generalisierte Lymphadenopathie kann auftreten. Die Veränderungen sind in der Mehrzahl der Fälle symmetrisch (60). Eine pulmonale Beteiligung liegt bei 60 - 80 % der Patienten vor (129). Es wird sogar vermutet, daß es keine Sarkoidose ohne Lungenbeteiligung gibt (110, 43). Spontanremissionen des Lungen-Boeck können auftreten. Die thorakale Sarkoidose wird in verschiedene Stadien nach unterschiedlichen Autoren wie folgt eingeteilt.

Einteilung nach Wurm und Siltzbach, 1958 (168, 134):

Stadium I : Befall der Hiluslymphknoten, Lunge frei

Stadium II : Befall der Lymphknoten und der Lunge

Stadium III: Lungenfibrose

Einteilung nach Scadding, 1967 (81):

Gruppe I : Befall der Hiluslymphknoten, Lunge frei

Gruppe II : Befall der Hiluslymphknoten und der Lunge

Gruppe III: Befall der Lunge ohne Lymphknotenvergrößerung

Gruppe IV : Lungenfibrose (Lungenbefall von 2 Jahren und mehr)

Klinische, radiologische, histologische und Lungenfunktionsuntersuchungen zeigen, daß schon während des sog. Stadiums I die Lunge, aber auch andere Organe, bei zunächst unauffälligem Röntgenbild der Lunge, diffus befallen sein können (133). Crystal et al konnten zeigen, daß die Sarkoidose der Lunge als diffuse Alveolitis beginnt. Eine Vermehrung von Helfer-T-Lymphozyten in der Bronchiallavageflüssigkeit konnte schon bei sehr frühen Stadien festgestellt werden (25).

Zu etwa 50 % sind die Patienten bei Diagnosestellung symptomlos, es sei denn, es handelt sich um einen akuten Morbus Boeck, das sog. Löfgren-Syndrom. Die akute Sarkoidose kann febril, gelegentlich sogar hoch febril und in Schüben mit Leukozytose verlaufen. Die Blutsenkungsreaktion ist dabei meist stark beschleunigt. Zu den Hauptsymptomen zählt das vorwiegend an den unteren Extremitäten meist doppelseitig auftretende Erythema nodosum (22). Entzündliche Gelenkveränderungen, besonders der großen Gelenke, werden oft beobachtet.

Bei der chronischen oder auch subakuten Form zeigt der Patient selten typische Symptome. Auch der Befall des Lungparenchyms (Stadium II nach Wurm, Stadium II und III nach Scadding) verursacht oft keine Krankheitszeichen.

Nur 20 - 30 % der Patienten klagen über unproduktiven Husten oder Dyspnoe. Im Stadium der Fibrose, die wie eine Lungenfibrose anderer Ursache verläuft, werden Husten, Dyspnoe und herabgesetzte Leistungsfähigkeit zu obligaten Symptomen (133).

Der Röntgenbefund ist vor allem bei stummen Verlaufsformen der erste Hinweis auf eine Sarkoidose. Die erweiterte radiologische Stadieneinteilung der Lungsarkoidose erfolgt nach Wurm et al wie folgt (168):

Stadium I

Bihiläre Lymphknotenvergrößerung ohne röntgenologisch nachweisbare Lungenveränderung, evtl. mit Vergrößerung der mediastinalen Lymphknoten.

Stadium II

II a: Retikuläre Form

II b: Miliare Form oder kleiner Einzelherd

II c: Kleinfleckige Lungenherde bis 5 mm Größe

II d: Grobfleckige Lungenherde über 5 mm Größe

Stadium III

III a: Lungenfibrose mit Konglomeratbildung

III b: Lungenfibrose ohne Konglomeratbildung

Tab. 5 Röntgenologische Stadieneinteilung der Lungsarkoidose nach Wurm, Reindell und Heilmeyer (168).

In jedem Stadium sind atypische Erscheinungsformen möglich (22, 43, 67). In der röntgenologischen Differentialdiagnose kommt es besonders darauf an, eine Sarkoidose von einer Tuberkulose, einer Silikose oder Pneumokoniose, einer Lymphogranulomatose und einer malignen Hamman-Rich-Fibrose zu unterscheiden (43, 133).

Die ⁶⁷Galliumszintigraphie vermag in der Verlaufskontrolle eine weiter bestehende oder sogar fortschreitende Granulomatose mit zunehmender Fibrosierung zu erkennen (144). Durch die Galliumszintigraphie kann nicht nur der durch die Granulomatose bedingte Lungeninfiltrationsgrad beurteilt werden, sondern es können auch vergrößerte Lymphknoten in ihrer Aktivität kenntlich gemacht werden (145).

Wesentliche Bedeutung bei der Diagnose-Erstellung der Sarkoidose kommt der Biopsie und der nachfolgenden histologischen Aufarbeitung des Materials zu. Vergrößerte periphere Lymphknoten werden exzidiert, mediastinale Lymphknoten durch Mediastinoskopie gewonnen. Gelegentlich werden trans-tracheale und transbronchiale Nadelbiopsien entnommen (73). Die Gewinnung von Lungengewebe erfolgt im Rahmen der Bronchusbiopsie durch trans- und peribronchiale Nadel- oder Zangenbiopsien. Es ist auch möglich, mit einer flexiblen Gastroskopiezange durch ein starres Bronchoskop hindurch unter Bildwandlerkontrolle Gewebe aus der Lungenperipherie zu entnehmen (2). Mit dieser Technik werden ähnlich wie bei der Mediastinoskopie hohe Trefferquoten erreicht (130). Probebiopsien aus anderen befallenen Organen sollten bei bestehender Indikation in üblicher Weise entnommen werden.

Das klinische Routinelabor zeigt bei der Sarkoidose keine Charakteristika. Die Blutsenkungsreaktion korreliert nicht mit dem Aktivitätsstadium der Erkrankung. Ein sarkoidose-typisches Blutbild gibt es nicht, wohingegen Lymphozytosen und Lymphozytopenien manchmal prognostische Hinweise geben können. Linksverschiebungen und Gamma-Globulin-Erhöhungen treten gehäuft bei chronischen Verläufen auf (15). Ein ungeordneter Calciumstoffwechsel mit Hypercalzämie und Hypercalziurie, zuweilen verbunden mit Nephrocalzinose, Nephrolithiasis und Niereninsuffizienz kann vorkommen (133), steht aber in keinem Zusammenhang mit Knochenaffektionen (110).

Im Stadium III der Sarkoidose nach Wurm kann es bei bestehender respiratorischer Insuffizienz zu einer Polyglobulie kommen.

Wesentlich aufschlußreicher sind immunologische Parameter.

In befallenen Lymphknoten und Lungenherden gelingt der Nachweis von Immunglobulinen und Komplementkomponenten.

Zirkulierende Immunkomplexe konnten gelegentlich im Serum nachgewiesen werden. Ig-G-Komplexe waren häufig, Ig-E-Komplexe nie nachzuweisen. Die Immunelektrophorese zeigt inkonstant erhöhte Werte für Ig A, Ig G und Ig M (63, 107, 121). Patienten mit aktiver Sarkoidose sollen einen signifikanten Anstieg von aktivierten T-Lymphozyten im peripheren Blut aufweisen, was für eine Immungenese spräche (122). Andere Autoren fanden hingegen nur einen leichten Anstieg oder sogar einen Abfall (57, 66).

Lieberman wies als erster im Serum von Patienten mit Sarkoidose signifikant erhöhte ACE-Aktivitäten nach, als er versuchte herauszufinden, welches Verhalten das Serum-ACE bei chronischen Lungenerkrankungen zeigt. Damals wurde angenommen, daß das im Plasma enthaltene ACE vollständig der Lunge entstammt, da in diesem Organ die höchsten spezifischen ACE-Aktivitäten nachgewiesen worden waren. Lieberman konnte ferner nachweisen, daß die Höhe des ACE-Spiegels im Blut mit dem Aktivitätszustand der pulmonalen Sarkoidose korreliert (74). Dieser Zusammenhang wurde zwischenzeitlich von anderen Autoren bestätigt (8, 9, 10, 41, 135, 136, 153, 160). Die Angaben über die Häufigkeit erhöhter Enzymspiegel während des Krankheitsverlaufes schwanken zwischen 29 und 86 % (8, 74, 131). Auch bei Kindern, die gegenüber Erwachsenen erhöhte Serumaktivitäten haben, konnte im Falle einer Sarkoidoseerkrankung ein signifikanter Enzymaktivitätsanstieg ermittelt werden (115). DeRemee konnte zeigen, daß bei einer großen Anzahl von Patienten mit sicher diagnostizierter Sarkoidose des Stadium I nach Wurm normale ACE-Aktivitäten vorlagen. Die Hälfte dieser Patienten zeigte im Krankheitsverlauf spontane Vollremissionen

(34). Ebenso werden im Stadium III, bei inaktiven und stationären Formen gelegentlich normale Plasma-ACE-Spiegel gefunden (34, 163). ACE-Aktivitätserhöhungen wurden, allerdings geringer als bei der Sarkoidose, bei Asbestose, Berylliose, Silikose und Tuberkulose nachgewiesen. ACE-Aktivitätsbestimmungen sind jedoch laut Wurm kein Ersatz für bioptische Untersuchungen (169). Die verminderte Tuberkulinempfindlichkeit der Sarkoidose-Patienten ist als diagnostisches Kriterium zu ungenau. In der Regel liegt eine Hyporeaktion vor, die durch funktionelle Beeinträchtigung der Lymphozyten bedingt sein soll. Absolute Tuberkulin-negativität liegt nur in etwa der Hälfte der Fälle vor (14). Neben der Tuberkulin-Anergie besteht eine Anergie gegen weitere Hautallergene wie Mumps, *Candida albicans*, Trichophyten, Histoplasmin und Pertussis (75). Von geringer klinischer Bedeutung ist auch die KVEIM-Hautreaktion bei der sich am Ort der intradermalen Injektion des KVEIM-Antigens im positiven Fall nach 4 - 6 Wochen eine Papel ausbildet. Diese Papel zeigt den gleichen ultrastrukturellen Aufbau wie ein echtes Sarkoidosegranulom. Zur exakten Auswertung des Tests ist eine Hautbiopsie erforderlich. Falsch negative Resultate kommen oft vor (169).

Die häufige Diskrepanz zwischen Lungenbefund und objektivierter Lungenfunktion macht die Dringlichkeit der Lungenfunktionsdiagnostik deutlich (35). Früheste Störungen schon im Stadium I nach Wurm zeigt die Diffusionskapazität. Typisch für die Sarkoidose ist eine restriktive Atemfunktionseinschränkung (35).

1.4.5. Zur Therapie

Bei akuten Verlaufsformen der Sarkoidose ist bei etwa 50 - 70 % der Patienten mit einer Spontanheilung innerhalb von 1 - 2 Jahren zu rechnen. Man kann sich bei dieser

Verlaufsform auf eine rein symptomatische, analgetische Medikation des Fiebers oder der Gliederschmerzen beschränken. Ebenso die chronische Sarkoidose neigt, wenn auch zu geringerem Prozentsatz, zur Spontanheilung und bedarf bei asymptomatischer Verlaufsform keiner Therapie (113).

Indikationen für eine medikamentöse Therapie ergeben sich bei Lungensarkoidose der Stadien II und III bei objektivierbarer Einbuße der Lungenfunktion oder radiologisch erkennbarer Krankheitsprogredienz. Im Stadium III muß zur Vermeidung weiterer Fibrosierung auf jeden Fall therapiert werden (33).

Bei Befall des Myokards und ZNS muß bei begründetem Verdacht die sofortige Einleitung einer hochdosierten Kortikoidtherapie erfolgen (170, 53).

Bei sarkoidoseverdächtigem Augenbefund muß zur Vermeidung möglicher schwerwiegender Folgen eine Kortisonmedikation rechtzeitig begonnen werden (152).

Die Hautsarkoidose kann aus vornehmlich kosmetischen Gründen, aber auch wegen der Gefahr entstellender Narbenbildungen, aktives Vorgehen erfordern (170).

Knochenveränderungen, die mit funktionellen Störungen einhergehen oder Komplikationen befürchten lassen, müssen ohne Rücksicht auf den Thoraxbefund therapiert werden.

Weitere Organe bzw. Organsysteme stellen bei entsprechendem Befall, Funktionsverlust oder weiteren Komplikationsmöglichkeiten Indikationen zur Einleitung einer medikamentösen Therapie dar (113).

Angriffsobjekt für die Sarkoidose-Therapie sind die spezifischen Granulome. Es kommt primär darauf an, die Proliferations-tendenz zu unterbinden und die Resorption des Granulationsgewebes einzuleiten, um so der Entwicklung einer irreparablen Fibrose entgegenzuwirken. Zu diesem Zweck kommen Medikamente in Betracht, die im Sinne einer Suppressionstherapie geeignet sind, die hyperergische Reaktionslage zu unterdrücken (77).

Mittel der Wahl bei der Sarkoidosebehandlung sind die Glukokortikoide, deren antiphlogistische Wirkung im Vordergrund steht. Mit Ausnahme gelegentlicher lokaler Applikationen bei Augensarkoidose oder Hautbefall handelt es sich beim Einsatz der Corticosteoride um eine systemische Behandlung, für welche unabhängig von der jeweiligen Organbeteiligung die gleichen Richtlinien gelten. Abgesehen von einer kurzfristigen Anwendung beim Löfgren-Syndrom muß immer eine Langzeittherapie durchgeführt werden, die meist über Jahre hinweg erforderlich ist (170).

Die mit einer Corticosteroidlangzeittherapie verbundenen Nebenwirkungen verleiten oft zu unzureichender Dosierung und kurzfristiger Behandlungsdauer. Es ist jedoch zu beachten, daß das Ausmaß der Nebenwirkungen von der zugrunde liegenden Erkrankung abhängig ist. So fand man, daß bei der Behandlung von Sarkoidose-Patienten die üblichen Nebenwirkungen in viel geringerem Ausmaß auftreten sollen (77).

Bei der Behandlung der Lungensarkoidose empfiehlt sich eine relativ hohe Initialdosis von 40 - 80 mg Prednison-Äquivalent täglich über einen Zeitraum von etwa 4 - 6 Wochen. Nach eingetretener Besserung wird in monatlichen oder längeren Abständen die Dosis auf ca. 8 mg täglich oder 15 mg jeden zweiten Tag reduziert. Bei den oben genannten extrathorakalen Indikationen medikamentöser Therapie wird bezüglich Dosierung und Behandlungsdauer in ähnlicher Weise verfahren (170).

Die Beurteilung des Behandlungserfolges ergibt sich bei der Lungensarkoidose aus der Befundänderung im Röntgenbild und vor allem lungenfunktionsanalytisch durch den Verlauf der pulmonalen Diffusions-Kapazität, bei der Hautsarkoidose aus dem Rückgang der Infiltrate etc. Die Dauer der Behandlung richtet sich nach dem Ergebnis ständiger klinischer Kontrolluntersuchungen. Entsprechend kann eine Dosisverminderung eingeleitet werden. Das Verhalten der ACE-Aktivität hat laut Wurm (169) nur bedingten Wert; denn erhöhte Aktivitäten halten oft lange Zeit nach Erlöschen klinischer Krankheitsaktivitätszeichen

noch an. Baur und Rømer beschreiben dagegen einen Abfall erhöhter ACE-Aktivitäten auf Normalwerte innerhalb von Wochen bei mit Prednisolon behandelten Patienten, bei gleichzeitiger klinischer Befundbesserung (8, 9, 117, 163). Rømer als auch Grønhagen-Riska (50) nehmen an, daß der Abfall der ACE-Aktivität mit der kortisonbedingten Granulomresorption korreliert; denn den Epitheloidzellen des Sarkoidose-Granuloms wird die hohe ACE-Bildungsrate zugeschrieben.

Als sonstige Therapieform ist bei vitaler Indikation oder bestehender Corticoidresistenz die Zytostatiktherapie mit Methotrexat, Endoxan oder Oncovin (113) selten angezeigt. Therapeutische Versuche mit Resochin und D-Penicillinamin haben sich als nicht brauchbar erwiesen. Auch Spironolacton zeigte keinen Einfluß auf das morphologische Sarkoidosesubstrat (113). Über Versuche im Sinne einer Immunstimulation mit BCG-Tuberkulin, Levamisol oder Thymosin können derzeit noch keine zuverlässigen Aussagen gemacht werden (170). Flankierende Maßnahmen wie Bewegungstherapie, Klimakuren, eiweißreiche und kohlenhydratarme Kost, eventuelle tuberkulostatische Abschirmung und die Therapie interkurrenter Infekte haben sich als sinnvoll erwiesen (170).

1.5. Problemstellung

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, die zur Aktivitätsbestimmung des menschlichen Serum-ACE verwendete Methode nach Cushman und Cheung auf ihre routinemäßige Verwendbarkeit zu überprüfen und damit ermittelte Ergebnisse für ca. 350 Patienten mit V.a. Sarkoidose zu analysieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine differenzierte Aktivitätsbestimmung (Messung der Hemmbarkeit mit ACE-Inhibitoren (in vitro) oder säulenchromatographische Auftrennung von Isoenzymen) die Aussagemöglichkeiten, z.B. über Lokalisation der Krankheitsprozesse, zu verbessern vermag.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Methoden zur Bestimmung der ACE-Aktivität

Es stehen eine Reihe von Verfahren zur Messung der ACE-Aktivität im Serum, anderen Körperflüssigkeiten und Geweben zur Verfügung. In der klinischen Routine werden in der Regel spektralphotometrische, radiochemische oder fluorimetrische Meßtechniken unter Verwendung synthetischer Substrate eingesetzt. Diese Substanzen haben oft eine gewisse Ähnlichkeit mit dem wichtigsten natürlichen Enzymsubstrat des ACE, dem Angiotensin I.

2.1.1. Spektralphotometrische Methode nach Cushman und Cheung

Am bekanntesten und wohl auch am häufigsten eingesetzt ist die ursprünglich von Cushman und Cheung (29) entwickelte und später von Lieberman (74) und Tschankova (159) zur Messung im menschlichen Serum modifizierte Methode. Bei diesem Verfahren wird Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (Hip-His-Leu) als Enzymsubstrat verwendet. Der Verbindung wird enzymatisch unter Einwirkung des ACE die Hippursäure abgespalten, die daraufhin vom nicht umgesetzten Substrat durch Ausschütteln mit Äthylacetat abgetrennt und dann bei 228 nm spektralphotometrisch gemessen wird.

Da auch das nicht umgesetzte Substrat bei 228 nm Licht absorbiert, muß die Hippursäure vor der Messung quantitativ vom Enzymsubstrat abgetrennt werden.

Das filtrierte Serum wird zunächst in einem chloridhaltigen Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,3; 100 mM), der Hip-His-Leu als synthetisches Enzymsubstrat enthält, eine Stunde bei 37° C inkubiert. Dazu muß das Inkubationsgemisch im Eisbad angesetzt werden. Von jeder Probe werden drei Werte und ein Leerwert bestimmt. Im Inkubationsansatz der Probe sind 0,10 ml Sub-

stratstammlösung und 0,10 ml Probe (Serum, Homogenat etc.) enthalten. Dem Leerwert wird sofort 0,20 ml 1 N HCl zugesetzt, um eine Reaktion zu verhindern. Außerdem wird eine Probe angesetzt, der 10 µl einer ACE-Hemmer-Lösung beifügt ist. Dieses Röhrchen wird ebenfalls eine Stunde inkubiert und anschließend wie die anderen Proben behandelt. Auf diese Weise lassen sich Störungen z.B. durch Färbung oder Trübung des Serums oder Fremdenzymaktivitäten erkennen.

Es ist darauf zu achten, daß die Hip-His-Leu-Stammlösung, die im Kühlschrank aufbewahrt werden muß, unmittelbar vor dem Ansatz auf 37° C erwärmt wird. Die Inkubation erfolgt über eine Stunde bei 37° C im Wasserbad in Clinicon-Einmalplastikröhrchen (5 x 11 mm). Die Reaktion wird schließlich durch Zugabe von 0,20 ml 1 N HCl im Eisbad gestoppt. Die enzymatisch freigesetzte Hippursäure wird nun mit 1,5 ml Äthylacetat extrahiert und die Flüssigkeit daraufhin 10 Minuten bei 4° C und 2 500 rpm zentrifugiert. 1 ml des Äthylacetats (Überstand) muß nun im Trockenschrank bei 120° C 35 Minuten abgedampft (Glasröhrchen, 100 x 16 mm) und der Rückstand dann mit 2,0 ml 1 M NaCl aufgenommen werden. Die Hippursäurekonzentration kann anschließend spektralphotometrisch (Spektrometer: PM 4, Zeiss) in Quarzküvetten mit der Schichtdicke 1 cm, bei 228 nm gegen destilliertes Wasser oder Puffer gemessen werden.

Herstellung der benötigten Lösungen:

- Kalium-Phosphat-Puffer:

Lösung A: 21,5 g $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$, 10,95 g NaCl,
Aqua dest. ad 250,0 ml

Lösung B: 17,0 g KH_2PO_4 , 10,95 g NaCl,
Aqua dest. ad 250,0 ml

Lösung B wird solange zu Lösung A hinzugegeben bis sich ein pH von 8,3 einstellt.

- Hip-His-Leu-Stammlösung:

36,12 mg Hip-His-Leu-Trockensubstanz der Firma Sigma-Serva, Heidelberg wird in 10,0 ml Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,3; 100 mM) gelöst.

- MK-422-Inhibitor-Lösung
0,4 mg MK 422, der Firma MSD, werden in
1,0 ml Aqua dest. gelöst
- 1 N HCl-Lösung:
21,5 ml konzentrierte HCl (37 %), Aqua dest. ad 250,0 ml
- 1 N NaCl-Lösung:
29,25 g NaCl, Aqua dest. ad 250,0 ml
- Äthylacetat, p.a.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Für die Auswertung ist die Kenntnis des Extinktionskoeffizienten ϵ der Hippursäure erforderlich. Dieser beträgt in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 228 nm $9,8 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes

$$E = \epsilon \times c \times d$$

mit E = Extinktion, c = Hippursäurekonzentration und d = Schichtdicke der Küvette, läßt sich die Hippursäurekonzentration ermitteln. Es muß außerdem berücksichtigt werden, daß nach Angaben von Lieberman (74) und Bestätigung von Tschankova (159) 91 % (Recovery) der abgespaltenen Hippursäure mit Hilfe des Äthylacetats unter den genannten Bedingungen extrahierbar ist. Ferner ist zu beachten, daß nur 2/3 der Äthylacetatlösung abpipettiert wird und daß das Serum im Inkubationsgemisch im Verhältnis 1:1 verdünnt vorliegt. Für die Berechnung der Enzymaktivität dient der nachfolgende Ansatz:

$$ACEA = \frac{\Delta E \times 10^3 \times 1,5 \times 20}{9,8 \times 60 \times 0,91}$$

Die einzelnen Größen des Quotienten berücksichtigen folgende Vorgänge:

- 10^3 = Umrechnung mol in nmol
- 1,5 = Berücksichtigung des unvollständigen Abpipettierens des Äthylacetats (1,5 ml von 2,0 ml)

- 0,91 = Berücksichtigung der Wiederfindungsrate (91 %) der Äthylacetatextraktion
9,8 = Extinktionskoeffizient ϵ $\text{mMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
60 = Umrechnung Stunde in Minuten
20 = Verdünnungsfaktor (0,1 ml Serum verdünnt auf 2,0 ml im Endvolumen).

Der Endwert ergibt sich durch Multiplikation der gemessenen Extinktionsdifferenz (ΔE) mit dem Faktor 56,1. Häufig werden noch Werte angegeben, die mit Hilfe des Faktors 18,7 berechnet wurden, wobei $18,7 = 56,1/3$. Dieser Umrechnungsfaktor wurde zunächst von Lieberman (74) benutzt, später jedoch korrigiert. Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden in der vorliegenden Arbeit die Serum-ACE-Aktivitäten unter Verwendung des zuerst von Lieberman angegebenen Umrechnungsfaktors (18,7) berechnet.

Die Dimension der Endwerte ist nanoMol umgesetztes Substrat pro Mililiter Serum pro Minute Inkubationszeit.

2.1.2. Fluorimetrische Methode nach Piquilloud, Reinharz und Roth

Für die von Piquilloud, Reinharz und Roth (100) ausgearbeitete Methode wird Benzyloxycarbonyl-Phenyl-Histidyl-L-Leucin (Z-Phe-His-Leu) als Enzymsubstrat eingesetzt. Von diesem spaltet ACE das Dipeptid His-Leu ab, das anschließend durch Reaktion mit ortho-Phthaldialdehyd zu einem fluoreszierenden Komplex umgesetzt wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit der His-Leu-Bildung wird als Maß der ACE-Aktivität verwendet. Die Konzentration der fluoreszierenden Additionsverbindung muß dann mit einem Fluorimeter gemessen werden, nachdem das Gerät mit His-Leu-Lösungen bekannter Konzentration geeicht worden ist.

Diese Methode ist von den routinemäßig einsetzbaren als die empfindlichste anzusehen. Sie ist daher besonders geeignet

zur Messung von ACE-Aktivitäten in Zellkulturen, aber auch im Liquor und Urin, sowie Mikroproben. Wie allgemein bei fluorimetrischen Verfahren, ist eine längere Einarbeitungszeit erforderlich.

Die Inkubation erfolgt in einem chloridhaltigen Borax-Phosphat-Puffer (pH 8,0) nach Zusatz der Enzymsubstratstammlösung eine Stunde bei 37° C in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen. Das Inkubationsmedium enthält 500,0 µl Borax-Phosphat-Puffer (pH 8,0), 10 µl unverdünnte Probe mit der zu messenden ACE-Aktivität (z.B. Serum, Liquor etc.) und 25 µl frisch gelöste Substratstammlösung. Nach einstündiger Inkubation im Wasserbad wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 4 N NaOH gestoppt. Das abgespaltene Dipeptid wird durch Zugabe von 25 µl ortho-Phthaldialdehyd zum fluoreszierenden Phthaldialdehyd - His-Leu-Komplex umgesetzt. Nach 10 Minuten muß 50 µl 12 N HCl zugesetzt werden. Man läßt das Gemisch 30 Minuten bei Zimmertemperatur im abgedunkelten Raum stehen und zentrifugiert es anschließend eine Minute bei 2 000 rpm in einer Eppendorfs-zentrifuge. Die Fluoreszenzintensität des His-Leu-Komplexes wird darauf mit Hilfe des Zeiss Spektralphotometers, PM Q II, mit Fluoreszenzzusatzeinrichtung bei 500 nm (Anregung 365 nm) in Quarzküvetten gemessen. Voruntersuchungen haben gezeigt, daß für die Messung ein Volumen von 100 µl ausreichend ist und daß die Messung 30 bis 90 Minuten nach der letzten Umsetzung erfolgen sollte (147).

Zur Eichung werden Standardlösungen angesetzt mit His-Leu-Konzentrationen im Bereich 280 ng/ml bis 2030 ng/ml. Es wird eine His-Leu-Stammlösung verwendet, die 7,0 mg His-Leu in 100,0 ml i-Propanolol (20 %) gelöst enthält. Bei einem Molekulargewicht des Dipeptids von 268,31 entspricht das einer Konzentration von 0,261 mMol His-Leu/l. Aus dieser Stammlösung werden 2, 4, 6, 8, 10 und 15 µl entnommen, mit 50 µl 4 N NaOH, 25 µl ortho-Phthaldialdehyd und 50 µl 12 N HCl versetzt und, wie oben beschrieben, verfahren.

Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen sind in nachfolgender Tabelle angegeben:

μl His-Leu Stammlsg. ad 500 μl	ng His-Leu/ml	nMol His-Leu/ml
0	0	0
2	277,68	1,04
4	553,17	2,07
6	826,48	3,09
8	1 097,63	4,11
10	1 366,66	5,12
12	1 633,59	6,12
15	2 030,10	7,60

Tab. 6 Herstellung und Konzentrationen der verwendeten Eichlösungen

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

- Borax-Phosphat-Puffer (pH 8,0)

Lösung A: 9,53 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$; 5,0 g NaCl
Aqua dest. ad 500,0 ml

Lösung B: 6,80 g KH_2PO_4 ; 5,0 g NaCl
Aqua dest. ad 500,0 ml

Lösung A wird solange zu Lösung B hinzugegeben bis sich ein pH von 8,0 einstellt. Der Puffer sollte dann 24 Stunden bei 4° C stehen, damit sich ein stabiles Gleichgewicht ausbildet.

- Z-Phe-His-Leu-Stammlösung:

Z-Phe-His-Leu (Fa. Bachem, Torrance, Ca., U.S.A.) wird in reinem Methanol (2mg/ml Methanol) unter ständigem Schütteln (Vortex) gelöst.

- ortho-Phthaldialdehyd-Lösung:

ortho-Phthaldialdehyd, rein, Fa. Merck, Darmstadt, wird in reinem Methanol (1mg/ml Methanol) gelöst.

- 12 N HCl

Konzentrierte HCl (37 %), Fa. Merck, Darmstadt

- 4 N NaOH: 80,0 g NaOH, Aqua dest. ad 500,0 ml

- His-Leu-Stammlösung:

7,0 mg His-Leu, (Fa. Bachem, Torrance, Ca., U.S.A.)

i-Propanolol 20 % ad 100,0 ml

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Zur Ermittlung der Enzymaktivität werden zunächst die Fluoreszenzintensitäten der Eichlösungen gemessen und darauf in einem Diagramm auf der Ordinate gegen die His-Leu-Konzentrationen auf der Abszisse aufgetragen.

In Abbildung 3 ist als Beispiel eine Eichkurve wiedergegeben.

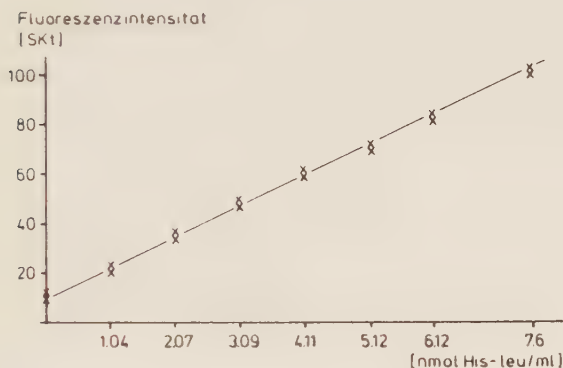


Abb. 3 Beispiel einer Eichung des Fluorimeters für die Bestimmung der ACE-Aktivität nach Piquilloud et al (100)

- Berechnung der Enzymaktivitäten im Serum:

Mit Hilfe der Eichkurve wird die Konzentration des Dipeptids ermittelt. Es ist jetzt nur noch die Verdünnung der Serumprobe zu berücksichtigen. Da das gesamte Inkubationsvolumen 535 μ l beträgt (500 μ l Puffer, 10 μ l Serum, 25 μ l Substratstammlösung), beträgt der Verdünnungsfaktor 53,5. Mit dieser Zahl ist der auf der Eichkurve abgelesene Wert zu multiplizieren. Die Dimension der Enzymaktivität lautet dann $[\text{nmol/ml} \times \text{h}]$.

- Berechnung der Enzymaktivitäten im Eluat einer Chromatographie:

Da die Versuchsbedingungen bei den chromatographischen Auftrennungen so gewählt waren, daß Verdünnungen des Eluats entbehrlich wurden, ist nur die geringe konstante Verdünnung durch die Substratstammlösung zu berücksichtigen. Der Verdünnungsfaktor beträgt in diesem Fall 1,04.

2.1.3. Radiochemische Methode

Das von Cushman (27) entwickelte und später von Lieberman (74) modifizierte Verfahren wurde von der Firma Ventrex Laboratories, Portland, Maine, U.S.A. weiterentwickelt. Der Einsatz eines radioaktiv markierten Enzymsubstrates führte zu einer vereinfachten Handhabung und zu einer verbesserten Meßempfindlichkeit. Es wurde das von der Firma Ventrex Laboratories entwickelte Verfahren (125, 162) unter Verwendung des Testansatzes der Firma Paesel, Frankfurt/Main, eingesetzt.

Die Konzentration der vom ^3H -markierten Substrat Hippuryl-Glycyl-Glycin (^3H -Hip-Gly-Gly) enzymatisch abgespaltenen Hippursäure wird nach einer Äthylacetat-Extraktion mit einem Flüssigkeitsszintillationszählgerät bestimmt.

In einem gekühlten Plastikröhrchen (3,0 ml, Firma Boehringer/Mannheim, Nr. 454907) wird 50 μl Serum mit 200 μl Hepes-Puffer (pH 8,0) verdünnt und davon 50 μl in einem anderen Röhrchen mit 50 μl ^3H -Hip-Gly-Gly versetzt. Das Gemisch wird 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Ansäuern (Zusatz von 1 ml 0,1 N HCl) gestoppt. Darauf gibt man 1 ml Äthylacetat hinzu, durchmischt 5 Sekunden mit einem Wirbelmischer und zentrifugiert 10 Minuten bei $1\,000 \times g$. Anschließend muß man 300 μl der oberen Phase vorsichtig abpipettieren und die Radioaktivität in einem Plastik-Szintillationsgefäß mit einem β -Zählgerät messen.

Herstellung der benötigten Lösungen:

- Testansatz der Firma Paesel GmbH
 - ^3H -markiertes ACE-Substrat Hip-Gly-Gly
 - 0,05 M Hepes-Puffer, pH 8,0
 - Kontrollserum: menschliches Plasma, angereichert mit einer ACE-Präparation vom Meerschweinchen
- 0,1 N HCl (Ampullen)
- Äthylacetat, rein

- Szintillationsflüssigkeit (0,7 % Butyl-PBD, Fa. Merck,
in Äthanol/Toluol 1:1)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien
der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Die Ergebnisse werden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Units} = \frac{800 \text{ nMol}}{\text{CPM}_{\text{Gesamt}} \times 60 \text{ Min} \times 0,01 \text{ ml}} \times (\text{CPM}_{\text{Probe}} - \text{CPM}_{\text{Blank}}) \times 3,3$$

Die einzelnen Größen des Quotienten berücksichtigen
folgende Vorgänge:

800 nMol: Substratkonzentration im Reaktionsgemisch
60 Min: Umrechnung Stunde in Minuten
0,01 ml: Probevolumen nach Berücksichtigung der Verdünnung
CPM_{Gesamt}: Zählrate des zugesetzten Substrats
CPM_{Probe}: Zählrate des abgetrennten Hippurats
CPM_{Blank}: Zählrate des Leerwertes
3,3: Berücksichtigung des unvollständigen
Abpipettierens des Äthylacetats (300 µl von 1 ml).

Die so berechneten Units entsprechen Nanomolen Hippursäure,
die pro Minute und pro Milliliter Serum oder Probe umgesetzt
werden.

2.1.4. Weitere Nachweismöglichkeiten

2.1.4.1. Radioimmunologische Verfahren

Dieses Verfahren ist derzeit für die klinische Routine nicht anwendbar, da die erforderlichen Antikörper und radioaktiv markiertes ACE vom Handel nicht angeboten werden. Der Nachweis erfolgt auf dem üblichen radioimmunologischen Weg.

Bei Verwendung von fluoreszierenden Antikörpern können histologische Untersuchungen zur Klärung der Mikrolokalisierung des ACE durchgeführt werden. Jedoch ist auch dieses Verfahren nur anwendbar, wenn die erforderlichen Ausgangsmaterialien zur Verfügung stehen oder in recht aufwendiger Weise selbst hergestellt werden.

Es kann auch mit Hilfe des Angiotensin-I-Radioimmunoassays die Aktivität des ACE bestimmt werden. Da das ACE als das Enzym definiert wurde, das aus dem Dekapeptid Angiotensin I unter Abspaltung des Dipeptids His-Leu das Octapeptid Angiotensin II bildet (38), darf diese Methode nicht vorbehaltlos verwendet werden; denn eine Carboxypeptidase, die der Reihe nach zuerst Histidin und dann Leucin vom A I abzuspalten vermag, darf nach der oben angegebenen Definition nicht als converting enzyme angesehen werden. Man kann den A I-Abbau sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit eines ACE-Hemmers durchführen und aus dem Ausmaß der Inhibition auf die ACE-Aktivität schließen. Dem steht jedoch entgegen, daß auch Carboxypeptidasen durch ACE-Hemmer inhibiert werden können (36). Es wird angenommen, daß diese Enzyme im Blut nur in geringer Aktivität enthalten sind. Bei der Verwendung dieses Verfahrens sollte sicherheitshalber geprüft werden, in welchem Maße durch ACE-Inhibitoren hemmbare Carboxypeptidasen in den Proben enthalten sind.

2.1.4.2. Gefäßstreifenmethode nach Helmer

Mit diesem Verfahren ist es möglich, auf indirektem Wege die ACE-Aktivität zu ermitteln. Hierbei wird eine spiralförmig aufgeschnittene Kaninchenaorta in einer Nährlösung eingespannt und das Ausmaß der Kontraktion mit Hilfe von empfindlichen Meßanordnungen, die minimale Längenveränderungen registrieren können, ermittelt. Wird nun AI mit einer ACE enthaltenen Probe unter optimalen Reaktionsbedingungen umgesetzt, so kann das Ausmaß der Angiotensin-II-Bildung, nach entsprechender Eichung, aus der Verkürzung des Präparates bestimmt werden (54). AI selbst führt zu keiner oder nur minimaler Gefäßreaktion. Nachteil dieses Tests ist, daß in den Organpräparaten selbst ACE enthalten ist, was zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führen kann. Bei exakter Reaktionsführung ist es jedoch auch so möglich ACE-Aktivitäten zu messen, wenn die jeweilige Eigenaktivität des Präparates berücksichtigt wird oder gegenüber den Meßdaten vernachlässigbar klein ist.

2.1.5. Vergleich von drei Methoden zur Aktivitätsbestimmung des ACE im menschlichen Serum

Zu diesem Zweck wurden 13 Serumproben verwendet. Zehn Seren stammten von Patienten. Außerdem wurden ein Mischserum und zwei Eichseren (ACE-Testansatz der Fa. Paesel) eingesetzt. Die Eichseren der ACE-Kits waren vom Hersteller mit Meer-schweinchen-ACE angereichert. Die Zahl der Proben war durch die Menge des radioaktiv markierten ACE-Substrates, das uns kostenlos zur Verfügung stand, limitiert. Für alle Proben wurden mit jeder der drei Methoden Doppelwerte bestimmt. Außerdem wurden von zwei Seren mit hohen ACE-Aktivitäten Verdünnungsreihen hergestellt und gemessen. Es erfolgten mehrmalige Verdünnungen im Verhältnis 2:1.

2.1.6. Untersuchungen über das Stabilitätsverhalten des Serum-ACE während der Aufbewahrung im gefrorenen Zustand (-18° C)

Zur Verbesserung der Meßgenauigkeit empfiehlt es sich, in jede Meßreihe Proben mit bekannter ACE-Aktivität einzuschließen. Derartige Standards sollten über mehrere Monate ihre Aktivität nicht oder nur wenig verändern. Es wurden für diesen Zweck Seren mit normaler, erhöhter und pathologisch erhöhter Serum-ACE-Aktivität jeweils getrennt gesammelt. Diese Standards wurden in 0,75 ml Portionen aufgeteilt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Gefrierschrank (ca. -18° C) aufbewahrt. In jede Meßreihe wurden zwei dieser Proben eingeschlossen. Es wurden jeweils ein Leerwert und drei Meßwerte von jedem der beiden Standards ermittelt. Mit Hilfe dieser als Standards verwendeten Mischseren, die bis zu 21 Monaten gefroren aufbewahrt wurden, kann eine Aussage über die Stabilität des Serum-ACE gemacht werden. Außerdem ist es damit möglich, Intraassay- und Interassayvariationskoeffizienten zu berechnen.

2.2. Differenzierung von Isoenzymen des ACE im menschlichen Serum durch Sephadex-Gelchromatographie (Molekulargewichtsbestimmung)

2.2.1. Prinzip der Gelchromatographie

Die Gelfiltration (Gelchromatographie) ist ein Trennverfahren, das eine Fraktionierung hochmolekularer Stoffe nach der Molekülgröße (Molekülsiebeffekt) erlaubt. Bei dieser Art der Säulenchromatographie wird die stationäre Phase von einem dreidimensional vernetzten, gequollenen, großmolekularen Stoff gebildet. Als Trägermaterialien werden Dextrane (z.B. Sephadex), Agarose oder andere vernetzte Makromoleküle, wie beispielsweise Polyacrylamid, verwendet (86).

Die aufzutrennenden, hochmolekularen Verbindungen sind in der flüssigen Phase enthalten, die das in einer Chromatographiesäule eingebrachte Gel passiert. Die zu untersuchenden Eiweißmoleküle können dabei in das Netzwerk diffundieren, sofern dieses aufgrund ihrer Größe möglich ist. Die folgende Abbildung veranschaulicht das Fraktionierungsprinzip.

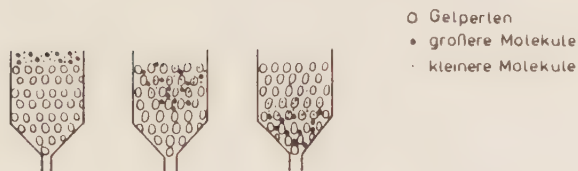


Abb. 4 Schematisiertes Prinzip der Gelfiltration (86)

Die kleineren Moleküle der mobilen Phase dringen durch Poren in die Gelkörner ein und werden so länger in der Säule zurückgehalten. Sie verlassen die Säule bei einem Elutionsvolumen, das in der Regel dem Volumen der gesamten Säulenfüllung entspricht. Moleküle, die größer sind als die größten Poren des gequollenen Gels, können die Gelkörner nicht durchdringen, wandern an diesen vorbei und erscheinen somit im Eluat nach einem Volumen, das dem sog. "void volume" entspricht (86). Die Moleküle erscheinen im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße. Da die Molekülgröße dem Molekulargewicht in der Regel direkt proportional ist, bietet die Gelfiltration eine Möglichkeit, Molekulargewicht zu bestimmen.

Sephadex (Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) ist eine Substanz, die im gequollenen Zustand aus kleinen Perlen mit 40 - 120 µm Durchmesser besteht. Es wird von mit Epichlorohydrin quervernetzten Dextranen gebildet.

Die große Anzahl der Hydroxyl-Gruppen macht das Gel außerordentlich hydrophil und erklärt seine gute Quellneigung in Wasser und Elektrolytlösungen. Die verschiedenen Sephadex G-Typen unterscheiden sich durch den Grad ihrer Quervernetzung, ihre Quellneigung, sowie ihren Fraktionierungsbereich.

Sephadex bietet gegenüber anderen Gelarten, bedingt durch seine chemischen und physikalischen Eigenschaften, einige Vorteile:

Es ist unlöslich in jeglichen Lösungsmitteln, kann über einen breiten pH-Bereich (pH 3-11) eingesetzt werden und ist bis zu 120° C hitzestabil (98, 166). Als Nachteil erweist es sich, daß Sephadex ein recht guter Nährboden für Bakterien ist. Es hat sich daher als nützlich erwiesen, dem Elutionsmittel ein Breitbandantibiotikum zuzusetzen.

Die mechanische Stabilität des Sephadex-Gels ist vom Grad der Quervernetzung abhängig.

Jeder Geltyp vermag, bedingt durch die Anzahl seiner Quervernetzungen, Proteine bestimmter Molekulargewichtsklassen zu trennen. So eignet sich das Sephadex-Gel G-200, der hier

verwendete Geltyp, zur Auftrennung von Proteinen, deren Molekulargewicht im Bereich von 10 000 - 220 000 liegt (97).

2.2.2. Eichung des Sephadex-Gels G-200

Vor der Ausführung der Gelfiltration ist die Sephadex-Säule zu eichen. Hierzu stehen fertige Eich-Kits (z.B. Gel Filtration Calibration Kit, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) zur Verfügung. Sie enthalten gereinigte Proteine mit bekannten Molekulargewichten. Für Sephadex G-200 sind dies:

Ribonuklease A (MG 13 700), Chymotrypsinogen A (MK 25 000), Ovalbumin (MG 43 000), Albumin (MG 67 000), Aldolase (MG 158 000), Catalase (MG 232 000) und Ferritin (MG 440 000).

Die Eichproteine werden in Konzentrationen von 5 bis 20 mg pro ml Elutionspuffer (Borax-Phosphat-Puffer, pH 8,0) gelöst aufgebracht. Die Firma Pharmacia empfiehlt, die Eichung in zwei Läufen durchzuführen (56, 97):

Lauf I:

Lauf II:

Ribonuklease A (10 mg/ml)

Chymotrypsinogen A (10 mg/ml)

Ovalbumin (10 mg/ml)

Albumin (10 mg/ml)

Aldolase (10 mg/ml)

Catalase (10 mg/ml)

Ferritin (2 mg/ml)

Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen den von uns gewählten Konzentrationen. Ferritin wurde wegen seiner intensiven Färbung und schlechten Löslichkeit in der Konzentration 2 mg/ml eingesetzt. Die Eichproteine wurden insgesamt in 1,0 ml Borax-Phosphat-Puffer, pH 8,0, unter ständigem Schütteln mit einem Vortex-Schüttelgerät gelöst; die nicht gelösten Anteile durch Filtration entfernt.

Im Eluat wird mit Hilfe eines Durchflußphotometers (LKB) die Extinktion E bei 280 nm bestimmt und diese in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen aufgetragen:

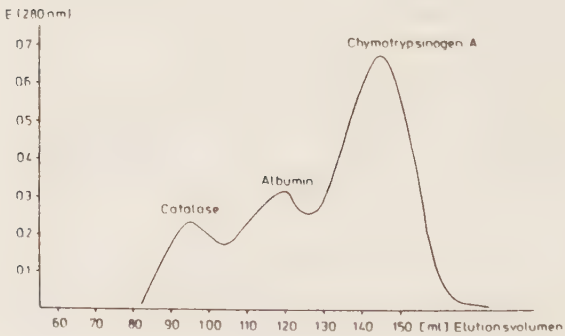
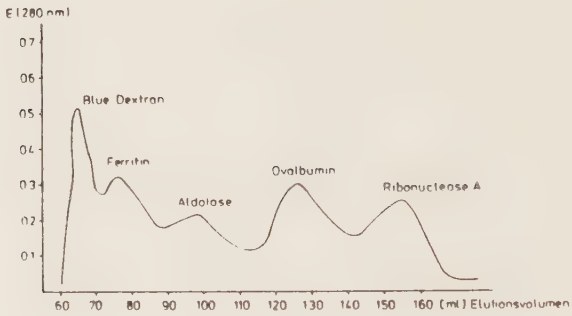


Abb. 5 und 6 Molekulargewichtseichung eines
Sephadex-Gels (G-200) in einer Säule
der Firma Pharmacia (K 25/100)

Für eine reproduzierbare Eichung ist es notwendig, das Elutionsvolumen V_0 jeder Eichsubstanz so exakt wie möglich zu bestimmen. V_0 wird gemessen vom Beginn der Probenauftragung bis zum Extinktionsmaximum. Das Extinktionsmaximum wird durch den Schnittpunkt zweier angelegter Tangenten bestimmt. Eine Molekulargewichtseichkurve repräsentiert die Beziehung zwischen dem Elutionsvolumen V_0 der Eichproteine und dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte (71, 102, 142) (Abbildung 7).

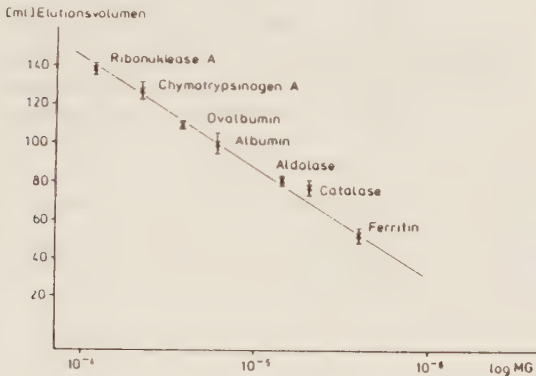


Abb. 7 Molekulargewichtseichkurve
Mittelwert aus 22 Eichläufen; $r = 0,996$.

2.2.3. Auftrennung der Proteine menschlicher Seren an dem Gel Sephadex G-200

Frisch entnommenes menschliches Blut wurde nach Abnahme 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 2 500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde mittels eines Siebüberlaufs abgenommen und anschließend filtriert, um Gerinnungsprodukte möglichst

vollständig zu entfernen. 2,0 ml Serum werden unverdünnt auf die Säule aufgetragen.

Für die Auftrennung verwendeten wir Chromatographierohre vom Typ K 25/100 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden). Das maximale Füllungsvolumen der verwendeten Säule beträgt 490 cm^3 . Am oberen und unteren Ende ist das Chromatographierohr mit je einem Durchflußadapter ausgerüstet. Ein Perlonsieb mit der Maschenweite $40 \mu\text{m}$ und ein weiteres gröberes Sieb bilden das Filtersystem der Adapter und fungieren als Träger der Säulenfüllung. Da die beiden Durchflußadapter die Säulenfüllung im Rohr fixieren, kann auf- und absteigend chromatographiert werden. Nach dem Säulendurchgang durchläuft das Eluat ein Durchlaufphotometer, das die Extinktion kontinuierlich bei 280 nm mißt und wird schließlich in einem Fraktionssammler (LKB) in $10 \times 100 \text{ mm}$ Glasröhrchen aufgefangen. Die Umschaltzeiten des Sammlers wurden je nach gewünschtem Fraktionsvolumen ($0,7\text{-}2,1 \text{ ml}$) zwischen 5 und 15 Minuten variiert, entsprechend einer durchschnittlichen Durchflußrate von etwa $1,7 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. Andere Autoren geben die optimale Durchflußrate zur Proteinauftrennung mit etwa $1,5 - 2,0 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ an (97).

Die Auftrennung erfolgte bei etwa 4°C im Kühlraum. Da in den Fraktionen die ACE-Aktivität mit Hilfe der fluorimetrischen Methode nach Piquilloud (100) bestimmt werden sollte, wurde zur Erhöhung der Meßgenauigkeit der zur Aktivitätsmessung benötigte Puffer (Borax-Phosphat-Puffer, pH 8,0) bereits zur Elution verwendet.

2.3. Patientengut

Die untersuchten Seren stammen ausnahmslos von Patienten der Pneumonologischen Abteilung des Klinikums Großhadern, bei denen die Serum-ACE-Aktivität größtenteils wegen Verdachts auf Sarkoidose bestimmt wurde. Von insgesamt 326 Patienten waren 194 Männer und 132 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug $42,1 \pm 15,5$ (SD) Jahre, das der Männer $42,9 \pm 15,0$, und das Durchschnittsalter der Frauen lag bei $40,9 \pm 16,2$ (SD) Jahren.

Bei einer Reihe von Erkrankten wurde das Verhalten der ACE-Aktivität während der Behandlung zu verschiedenen Zeiten wiederholt bestimmt. So lagen 44 Zweifach-, 16 Dreifach-, 7 Vierfach-, 5 Fünffach-, 1 Sechsfach-, 1 Siebenfach- und schließlich eine Zwanzigfach-Bestimmung vor.

Bei fünf Patienten wurde das Verhalten der Enzymaktivitäten und der prozentualen ACE-Hemmung unter Berücksichtigung der klinischen Befunde und der therapeutischen Maßnahmen untersucht. Bei diesen Erkrankten war die Diagnose der Sarkoidose histologisch abgesichert. In zwei Fällen handelte es sich um das Stadium I und in je einem Fall um die Stadien I - II, II und II - III.

Von 16 gesunden Probanden, 9 Männern und 7 Frauen im Alter zwischen 24 und 60 Jahren und vier anephrischen Patienten (1 Mann und 3 Frauen) des Zentrums Innere Medizin der Universität Ulm wurde die Serum-ACE-Aktivität gelchromatographisch aufgetrennt.

2.4. Statistische Methoden

Bei der Auswertung der Meßdaten des Patientengutes mit V.a. Sarkoidose und der Sephadex-Säulenchromatographien wurden für alle Untersuchungskriterien Mittelwert Mw mit Standardabweichung SD bzw. Variationskoeffizient Vk berechnet (108, 126).

Definitionen:

- Mittelwert $Mw = \frac{\sum x}{n}$
- Standardabweichung $SD = \sqrt{\frac{\sum (x - Mw)^2}{n - 1}}$
- Variationskoeffizient $= \frac{SD}{Mw} \cdot 100$
- x = Einzelmeßwert
- n = Anzahl der Meßwerte
- $\sum x$ = Summe der Einzelmeßwerte

Die Signifikanzen wurden mit dem Student-T-Test überprüft. Der Korrelationskoeffizient r diente als Maß für den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Die Regressionsgerade wurde nach

$$y = bx + a$$

berechnet, wobei b der Regressionskoeffizient die Steigung der Geraden und a den Schnittpunkt mit der Y-Achse angibt (108, 126).

Alle Rechnungen wurden mit dem "Casio-Calculator fx - 3600P" durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vergleich von drei Methoden zur Aktivitätsbestimmung des ACE im menschlichen Serum

In Tabelle 7 sind die Meßergebnisse zusammengestellt. Es wurden für jede Serumprobe mit jeder der drei Methoden jeweils Doppelwerte bestimmt und daraus die Mittelwerte gebildet.

In Abbildung 8 sind die mit den verschiedenen Methoden gemessenen ACE-Aktivitäten der einzelnen Patienten gegeneinander aufgetragen. In allen drei Fällen wurden lineare Abhängigkeiten beobachtet. Die Korrelationskoeffizienten betragen 0,963 beim Vergleich der radiochemischen mit der fluorimetrischen Methode, 0,770 für die radiochemische / spektralphotometrische und 0,817 für die spektralphotometrische / fluorimetrische Methode .

In Tabelle 8 und in Abbildung 9 sind die Meßwerte enthalten, die für zwei Seren mit erhöhter ACE-Aktivität vor und nach mehrmaligen Verdünnungen bestimmt wurden.

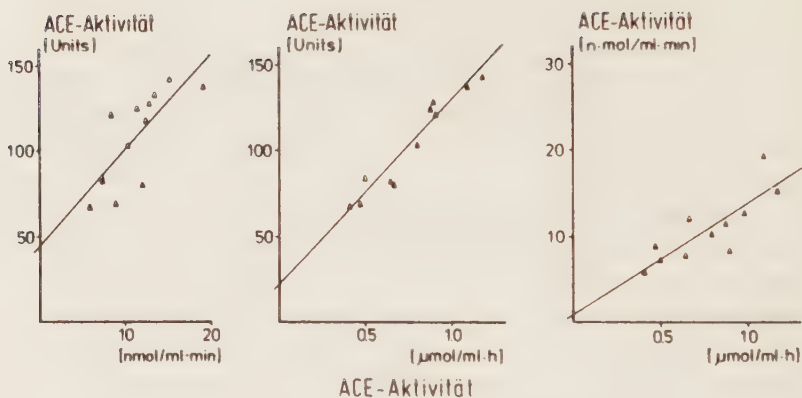


Abb. 8 Vergleich der mit jeweils zwei Methoden bestimmten ACE-Aktivitäten von 13 Seren.

- Links: Ordinate - Radiochem. Methode
Abszisse - Spektralphotometr. Methode
(Cushman/Lieberman)
- Mitte: Ordinate - Radiochem. Methode
Abszisse - Fluorimetrische Methode
(Piquilloud et al)
- Rechts: Ordinate - Spektralphotometrische Methode
Abszisse - Fluorimetrische Methode

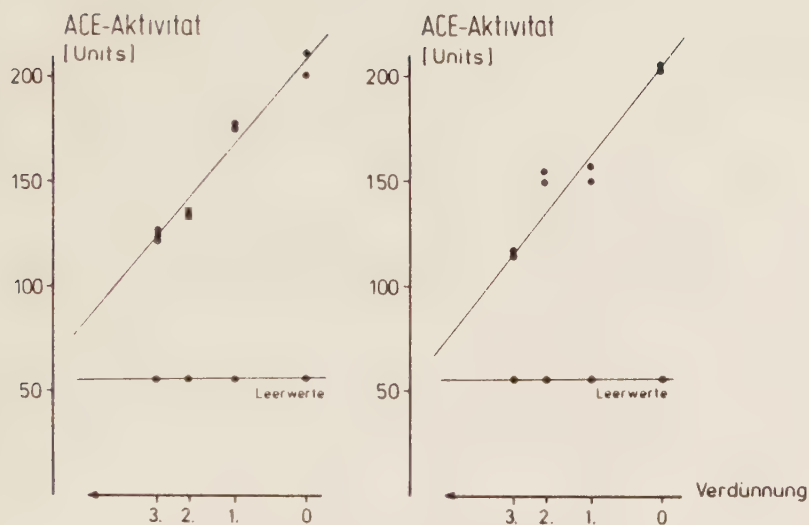


Abb. 9 ACE-Aktivitäten zweier Patienten vor und nach mehrmaligen Verdünnungen im Verhältnis 2:1. (Radiochemische Methode).

Patient	Radiochem. Methode		Spektralphoto- metr. Methode		Fluorimetr. Methode	
	EW	MW	EW	MW	EW	MW
B.	83,88	80,05	12,36	12,09	0,665	0,665
	76,21		11,82		0,665	
J.	129,37	128,74	12,64	12,83	0,890	0,895
	128,11		13,02		0,900	
E.	67,17	68,05	6,13	5,85	0,415	0,413
	68,92		5,57		0,410	
Hi.	142,69	142,74	15,26	15,36	1,190	1,175
	142,79		15,45		1,160	
Ho.	123,64	124,66	11,35	11,54	0,890	0,880
	125,68		11,73		0,870	
Sch.	137,93	137,79	19,04	19,32	1,077	1,095
	137,64		19,60		1,112	
MÜ.	68,53	69,21	8,86	8,96	0,475	0,470
	69,89		9,05		0,465	
Na.	102,64	103,71	10,02	10,29	0,810	0,800
	104,78		10,55		0,790	
Mu.	115,12	121,16	8,73	8,39	0,910	0,904
	127,20		8,04		0,897	
Hö.	83,16	84,42	6,96	7,33	0,500	0,500
	85,67		7,70		0,500	
Mischserum	83,50	82,82	7,22	7,27	0,605	0,643
v. Gesunden	82,13		7,31		0,680	
Kontroll-	142,40	133,70	13,82	13,64	---	---
serum 1	125,00		13,45		---	
Kontroll-	118,88	118,88	12,53	12,63	---	---
serum 2	118,88		12,72		---	

EW = Einzelwerte; MW = Mittelwerte

Tab. 7 Methodenvergleich

Messung von 13 Serumproben mit drei Methoden:
Radiochemische Methode (125,162), spektralphotometrische
Methode nach Lieberman (74) und fluorimetrische Methode
nach Piquilloud et al (100).

Verdünnung	Probe	Spektralphotometr.		Fluorimetr.		Radiochem.	
		Methode	Patient J. Patient Sch.	Methode	Patient J. Patient Sch.	Methode	Patient J. Patient Sch.
0.	Leerwert	1,98	2,49	0,353	0,335	55,79	55,79
	Meßwerte	16,16 16,46	15,33 15,67	0,835 0,840	0,850 0,865	205,16 204,20	199,54 211,73
	MW*	14,33	13,01	0,484	0,523	148,89	149,85
1.	Leerwert	1,96	2,73	0,360	0,327	55,79	55,79
	Meßwerte	8,60 8,53	9,35 9,37	0,703 0,700	0,800 0,810	151,37 157,18	175,45 177,74
	MW*	6,61	6,63	0,342	0,478	98,49	120,81
2.	Leerwert	2,02	2,47	0,350	0,330	55,79	55,79
	Meßwerte	5,97 5,98	7,09 7,12	0,540 0,555	0,615 0,630	150,42 153,46	135,95 133,38
	MW*	3,96	4,64	0,198	0,293	96,15	78,88
3.	Leerwert	2,08	2,21	0,353	0,340	55,79	55,79
	Meßwerte	3,98 4,10	4,58 4,68	0,505 0,503	0,565 0,555	116,43 114,43	123,86 125,19
	MW*	1,96	2,42	0,151	0,220	59,64	68,74
4.	Leerwert	1,91	2,30	0,335	0,330	---	---
	Meßwerte	2,86 2,79	3,61 3,52	0,425 0,428	0,480 0,485	---	---
	MW*	0,92	1,27	0,092	0,153	---	---
5.	Leerwert	1,96	2,15	0,340	0,340	---	---
	Meßwerte	2,41 2,36	2,54 2,64	0,400 0,392	0,387 0,392	---	---
	MW*	0,43	0,44	0,050	0,050	---	---

MW* = Mittelwert aus den beiden Meßwerten minus 0-Wert.

Tab. 8 Verdünnungsreihen

3.2. Untersuchungen über Stabilität des Serum-ACE und die Meßgenauigkeit (Interassay- und Intraassay-variationskoeffizienten) der Lieberman-Methode

3.2.1. Stabilitätsverhalten des Serum-ACE während der Aufbewahrung im gefrorenen Zustand (-18°C)

In Abbildung 10 ist die ACE-Aktivität in Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer im Gefrierschrank (ca. -18°C) für drei Mischseren aufgetragen.

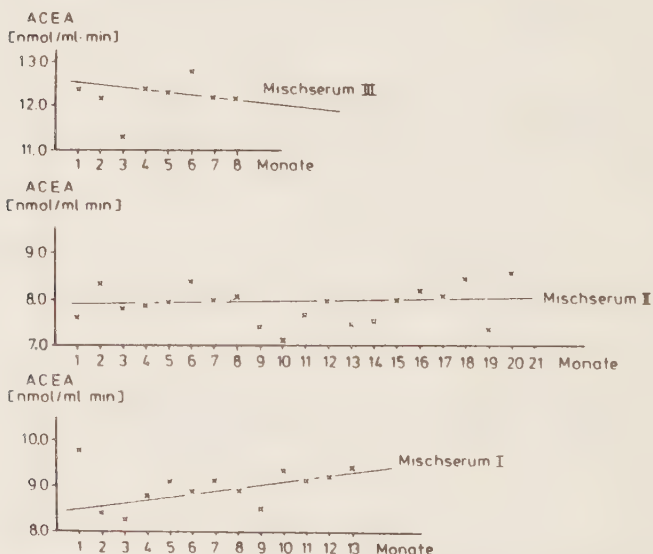


Abb. 10 ACE-Aktivität dreier Mischseren in Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer im Gefrierschrank (-18°C). Die Einzelmessungen wurden für jeden Monat gemittelt.

In allen Fällen konnten die Abhängigkeiten durch relativ flach verlaufende Geraden beschrieben werden.

Die Geradengleichungen sind nachfolgend angegeben:

Mischserum I: $y = 8,77 + 0,03 x$

Mischserum II: $y = 7,85 + 2,31 \cdot 10^{-4} x$

Mischserum III: $y = 12,62 - 0,06 x$

Die Regressionskoeffizienten sind alle recht niedrig.

Ein negativer Wert wurde nur für das Mischserum mit der pathologisch erhöhten ACE-Aktivität (Mischserum III) ermittelt.

Die monatliche Abnahme der Enzymaktivität beträgt selbst in diesem Fall nur 0,35 %. Für die beiden anderen Mischseren ergaben sich monatliche Veränderungen von 0,08 % für Mischserum II und 0,62 % für Mischserum I. Daraus resultiert eine mittlere monatliche Veränderung der Enzymaktivität von $0,35 \% \pm 0,27$ (SD).

3.2.2. Interassayvariationskoeffizient der Endwerte

In der nachfolgenden Tabelle 9 sind für die Mischseren I - III die Interassayvariationskoeffizienten für Endwerte und Extinktionen der Meß- und Leerwerte einzeln und gemittelt angegeben.

Es wurden die Ergebnisse von jedem Monat gemittelt.

Insgesamt konnten für Mischserum I 62, für Mischserum II 86 und für Mischserum III 30 Messungen berücksichtigt werden.

Für die Berechnung der Interassayvariationskoeffizienten wurde das Verhalten der ACE-Aktivität während der Aufbewahrungszeit nicht berücksichtigt. Daher ist auch der Variationskoeffizient für das Mischserum mit dem höchsten Regressionskoeffizienten am größten.

	Mischserum I	Mischserum II	Mischserum III	Mittelwert
Laufzeit	13 Monate	21 Monate	8 Monate	
Interassay-VK Endwert	7,23	6,40	5,54	6,39 $\pm$ 0,85 (SD) (n = 178)
Interassay-VK Extinktionswert der Probe	6,30	10,54	5,00	7,28 $\pm$ 2,90 (SD) (n = 178)
Interassay-VK Extinktion des Leerwertes	15,49	11,95	14,65	14,03 $\pm$ 1,85 (SD) (n = 178)

, 65 ,

Tab. 9 Interassayvariationskoeffizienten für End- und Zwischenwerte der mit der Lieberman-Methode gemessenen Serum-ACE-Aktivitäten.

3.2.3. Interassayvariationskoeffizienten der Zwischenwerte (Meß- und Leerwerte)

In Tabelle 9 sind die Interassayvariationskoeffizienten für End- und Zwischenwerte der mit der Lieberman-Methode gemessenen ACE-Aktivitäten von 3 Mischseren zusammengestellt.

Das Mischserum I konnte 13 Monate, Mischserum II 21 Monate und Mischserum III 8 Monate verwendet werden. Es werden die für alle 3 Mischseren gemittelten Variationskoeffizienten für den Endwert sowie für zwei Zwischenergebnisse angegeben.

3.2.4. Intraassayvariationskoeffizienten der Meßwerte

Der Intraassayvariationskoeffizient beträgt 1,4 % für Mischserum I und jeweils 2,0 % für die Mischseren II und III ($MW = 1,8 \% \pm 0,3 \text{ SD}$; $n = 178$).

3.2.5. Streubreite der Leerwerte

Insgesamt konnten für Mischserum I 124 Leerwerte doppelt erfaßt werden. Die mittlere prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Doppelbestimmungen beträgt 4,4 %.

Die gemittelten Extinktionen der Leerwerte betrugen für

Mischserum I $0,082 \pm 0,012 \text{ SD}$; $n = 124$, für

Mischserum II $0,082 \pm 0,010 \text{ SD}$; $n = 192$ und für

Mischserum III $0,086 \pm 0,013 \text{ SD}$; $n = 60$.

3.2.6. Überprüfung der Meßwerte auf Normalverteilung nach Gauß

In Abbildung 11 ist die Verteilung nach Gauß der Extinktionswerte ohne Berücksichtigung der Leerwerte für das Mischserum II wiedergegeben. Innerhalb einer Standardabweichung ($\pm 1 \text{ SD}$) konnten 68 % aller Meßwerte ermittelt werden.

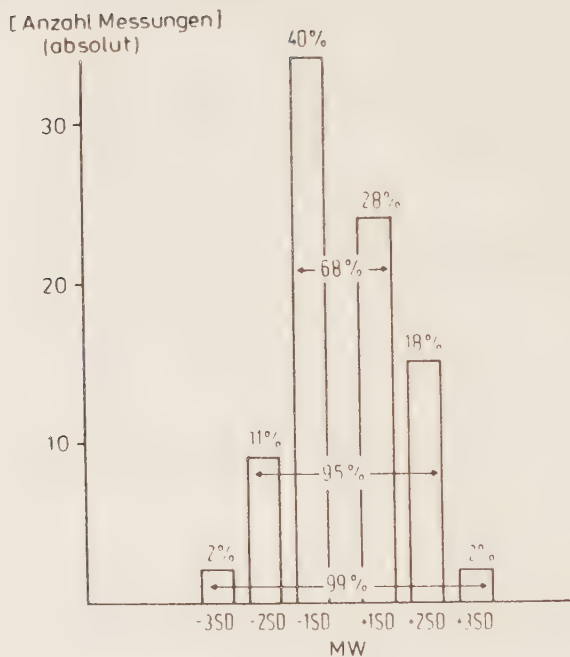


Abb. 11 Überprüfung der für das Mischserum II gemessenen Extinktionswerte ($n = 86$) auf Normalverteilung nach Gauß.

99,0 % aller Messungen sind im Bereich ± 3 SD,

95 % ± 2 SD und 68 % ± 1 SD vom Mittelwert entfernt.

	Normalverteilungs- Werte n. Gauß (108)	Mischserum I	Mischserum II	Mischserum III	Mittelwert Mischseren I-III
± 1 SD	68 %	72,6 %	67,9 %	81,3 %	73,8 % $\pm$ 7,0 (SD)
± 2 SD	95 %	98,4 %	95,3 %	93,0 %	95,6 % $\pm$ 2,7 (SD)
± 3 SD	99 %	100,0 %	99,9 %	100,0 %	100 % $\pm$ 0,02(SD)

- 58 -

Tab. 10 Überprüfung der Extinktionswerte für die Mischseren I bis III auf Normalverteilung nach Gauß.

Im Bereich von zwei Standardabweichungen (± 2 SD) waren es 95 % und im Abstand von drei Standardabweichungen (± 3 SD) konnten 99 % der Meßwerte erfaßt werden. Für alle drei Mischseren können die Verteilungswerte, die daraus errechneten Mittelwerte sowie die Normalverteilungswerte nach Gauß der Tabelle 10 entnommen werden.

3.3. Meßergebnisse der ACE-Aktivitätsbestimmung im Serum der Patienten

3.3.1. Normalbereich der ACE-Aktivität im menschlichen Serum

3.3.1.1. Gemittelte Serum-ACE-Aktivitäten der Patienten mit Enzymwerten im Normalbereich ($7,64 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 2 \text{ SD}$)

Von den 326 Patienten lagen 196 gemäß ihrer Serum-ACE-Aktivität im Normalbereich. Als Mittelwerte wurden $7,21 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 1,54$ (SD) insgesamt, für Männer $7,44 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 1,62$ (SD) und für Frauen $6,93 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 1,39$ (SD) berechnet.

Es konnte ein statistisch signifikanter Geschlechtsunterschied ermittelt werden ($p < 0,025$).

3.3.1.2. Mittelwert der Serum-ACE-Aktivitäten aller Patienten

Wird die mittlere Enzymaktivität für die Gesamtzahl der Patienten ($n = 326$) gebildet, so ergibt sich $7,47 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 3,47$ SD; $n = 326$, für Männer $7,73 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 3,65$ SD; $n = 194$ und für Frauen $7,10 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 3,16$ SD; $n = 132$. Auch in diesem Fall wurden für Männer erhöhte Enzymaktivitäten festgestellt, jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant.

3.3.2. Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitäten

3.3.2.1. Gesamtes Patientengut

In Abbildung 12 ist die Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitäten für das gesamte Patientengut graphisch dargestellt.

Auf der Abszisse sind die ACE-Aktivitäten zwischen 0 und 20 nmol/ml · min in zwanzig Bereiche aufgeteilt. Auf der Ordinate links ist angegeben, wieviel Prozent der Patienten den Aktivitätsbereichen zuzuordnen sind. Diese Angaben werden durch die leeren Säulen repräsentiert. Die absolute Angabe der Patientenzahl ist der rechten Ordinate zu entnehmen und wird durch die ausgefüllten Säulen dargestellt. Die schraffiert gezeichneten Anteile geben die Anzahl der Männer, die schwarzen die der Frauen wieder. Am häufigsten wurden Enzymaktivitäten im Bereich zwischen 5 und 7 nmol/ml · min ermittelt.

3.3.2.2. Einteilung in Männer und Frauen

Insgesamt wurden die Enzymaktivitäten für 194 Männer (59,5 %) und 132 Frauen (40,5 %) ermittelt. Im pathologischen Bereich, d.h. drei Standardabweichungen oberhalb des Mittelwertes gesunder Probanden, lagen 37 Patienten (= 11,3 %), davon entfielen 13 (3,9 %) auf Frauen und 24 (7,3 %) auf Männer. Bezieht man die Werte auf die insgesamt untersuchte Zahl von Männern bzw. Frauen, so wurden für 12,2 % der Männer und für 9,8 % der Frauen pathologische Enzymaktivitäten festgestellt.

3.3.3. Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten

3.3.3.1. Gesamtes Patientenkollektiv

In Abbildung 13 ist die Streubreite der Enzymaktivitäten für die Jahrgänge 1905 - 1972 graphisch dargestellt.

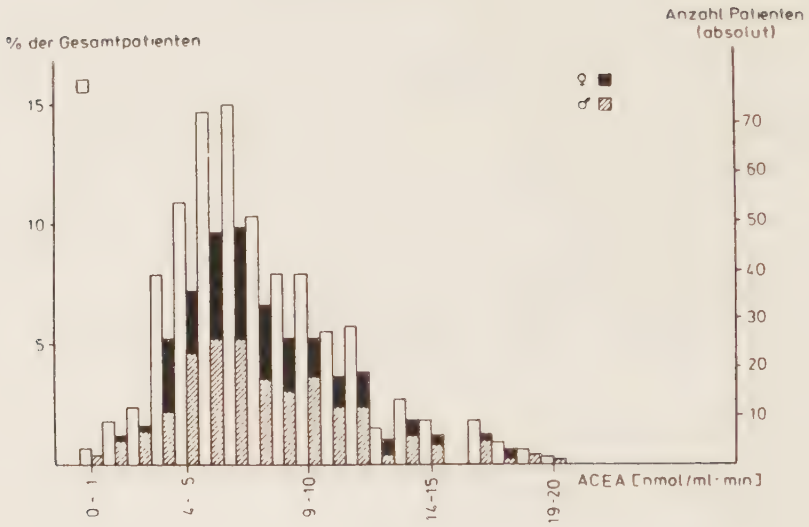


Abb. 12 Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitäten
aller Patienten mit V.a. Sarkoidose

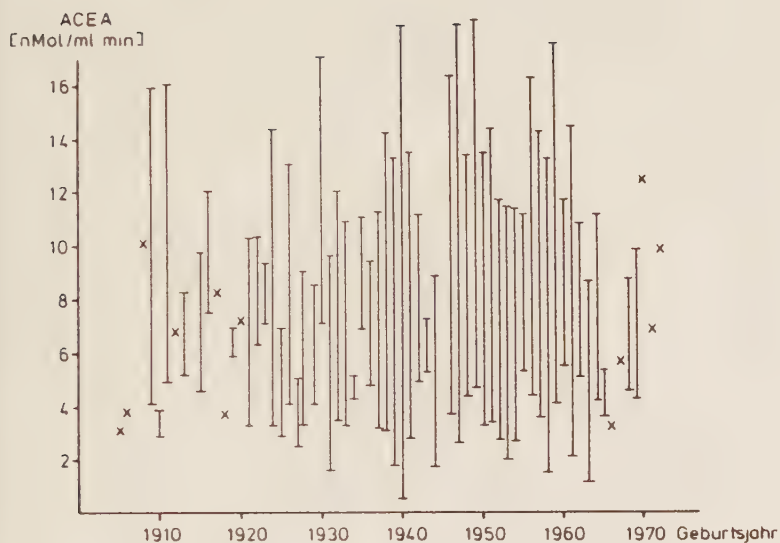


Abb. 13 Serum-ACE-Aktivitäten (Streubreite)
aller Patienten mit V.a. Sarkoidose
in Abhängigkeit vom Alter.

In Abbildung 14 ist die Zahl der insgesamt untersuchten Patienten in Abhängigkeit vom Alter aufgetragen. Daraus geht hervor, daß die Jahrgänge 1950 - 1960, d.h. die zur Zeit der Messung 25 - 36jährigen am stärksten vertreten sind.



Abb. 14 Anzahl der insgesamt untersuchten Patienten in Abhängigkeit vom Alter.

3.3.3.2. Einteilung in Männer und Frauen

Die Diagramme der Abbildung 15 geben die Verhältnisse für Männer und Frauen getrennt an. Bei den Frauen ist ein Maximum für die Jahrgänge 1952 - 1960 und bei den Männern ein Gipfel bei den Jahrgängen 1940 - 1950 erkennbar.

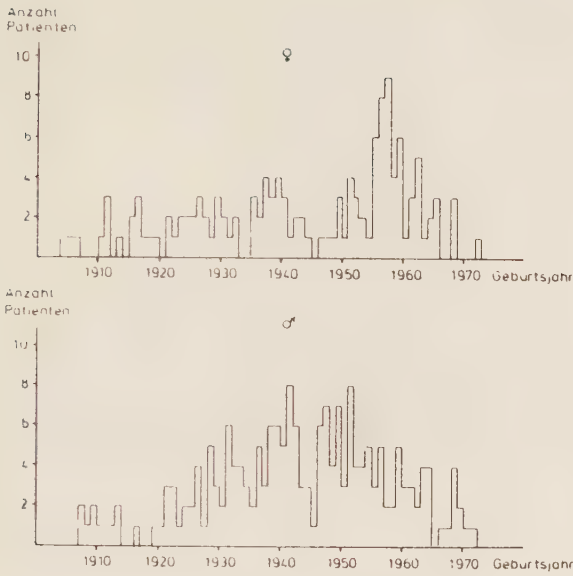


Abb. 15 Anzahl der insgesamt untersuchten Patienten
in Abhängigkeit vom Alter
oben: Frauen
unten: Männer

3.3.4. Mittlere Enzymaktivität

3.3.4.1. In Abhängigkeit vom Lebensalter

In Abbildung 16 ist die mittlere Serum-ACE-Aktivität in Abhängigkeit vom Alter dargestellt.

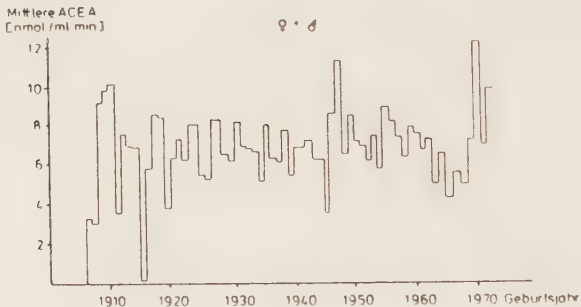


Abb. 16 Mittlere ACE-Aktivität in Abhängigkeit vom Alter für alle Patienten

3.3.4.2. In Abhängigkeit vom Geschlecht

In Abbildung 17 ist auf der Abszisse Geburtsjahr und auf der Ordinate Anzahl der Patienten (Männer und Frauen) angegeben, die Serum-ACE-Aktivitäten oberhalb des Normalbereiches, d.h. größer als $10,4 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}$ haben. Die weißen Säulen repräsentieren die Anzahl der insgesamt untersuchten Patienten, die schwarzen die Anzahl der Patienten, deren

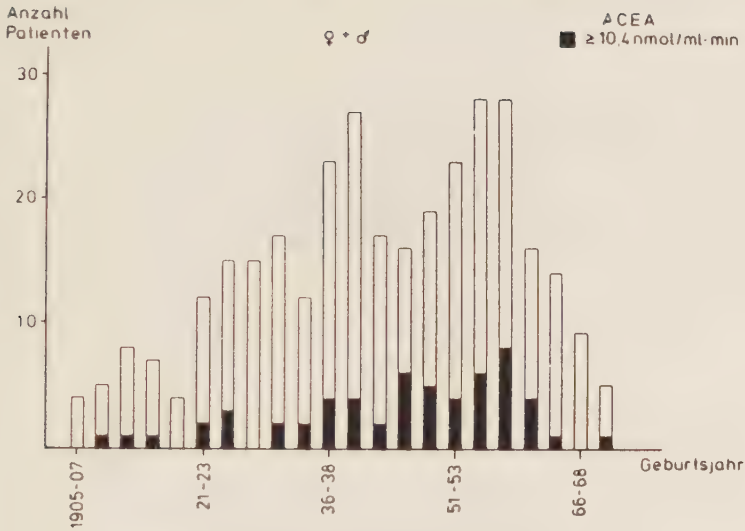


Abb. 17 Anzahl der insgesamt untersuchten Patienten (weiße Säulen) sowie der mit Enzymaktivitäten oberhalb des Normalbereiches, d.h. ACEA $> 10,4 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}$ (schwarze Säulen) in Abhängigkeit vom Alter.

Enzymaktivitäten oberhalb des Normbereiches liegen. Es ist zu erkennen, daß die meisten Patienten mit erhöhten ACE-Aktivitäten den Jahrgängen 1947 - 60 angehören.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse für Männer und Frauen getrennt aufgetragen. Bei den Männern wurden erhöhte Enzymaktivitäten hauptsächlich für die Jahrgänge 1945 - 47 ermittelt. Jedoch sind zwei weitere kleinere Maxima bei 1956 - 61 und 1938 - 43 zu beobachten. Bei den Frauen hingegen ist nur ein Maximum deutlich ausgeprägt. Dieses liegt zwischen den Geburtsjahren 1953 - 64.

3.3.4.3. In Abhängigkeit von der Zeit der Messung (Jahreszeit- bzw. Witterungseinflüsse)

In Abbildung 19 ist für einen Zeitraum von vier Jahren die Anzahl der untersuchten Patienten (Gesamthöhe der Säulen) in Abhängigkeit von der Zeit der Messung dargestellt. Der schraffierte Anteil der Säule repräsentiert die Anzahl der Männer, der ausgefüllte die der Frauen. Jeweils zu Jahresbeginn und im Herbst sind schwache Maxima ausgebildet.

In Abbildung 20 ist die Anzahl der Patienten mit erhöhten ACE-Aktivitäten ($> 10,4 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}$) in Abhängigkeit von der Zeit der Messung dargestellt. Auch in diesem Fall sind zwei Maxima schwach erkennbar, das erste im Februar/März und das zweite im Oktober.

3.3.5. In vitro-Hemmung der Serum-ACE-Aktivität mit dem ACE-Inhibitor MK 422

Es wurde die prozentuale Hemmbarkeit der Serum-ACE-Aktivität für 326 Patienten in Abhängigkeit von Geschlecht und Aktivitätshöhe untersucht.

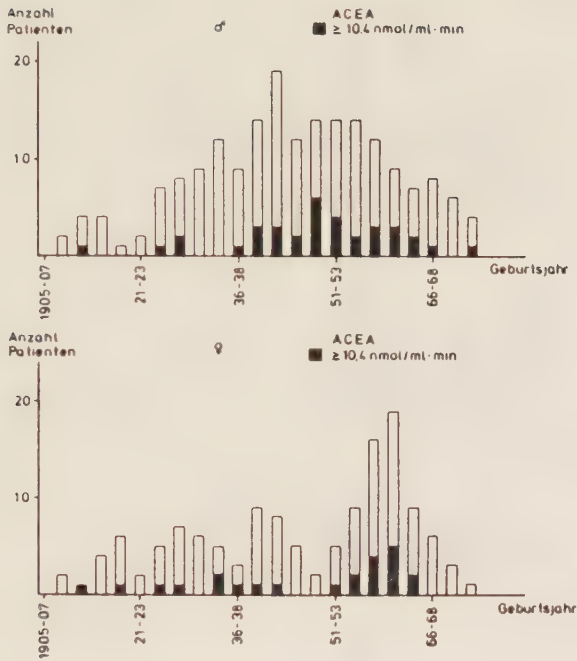


Abb. 18 Anzahl der insgesamt untersuchten Patienten (weiße Säulen) sowie der mit Enzymaktivitäten oberhalb des Normalbereiches, d.h. $\text{ACEA} > 10,4 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}$ (schwarze Säulen) in Abhängigkeit vom Alter.
oben: Männer
unten: Frauen

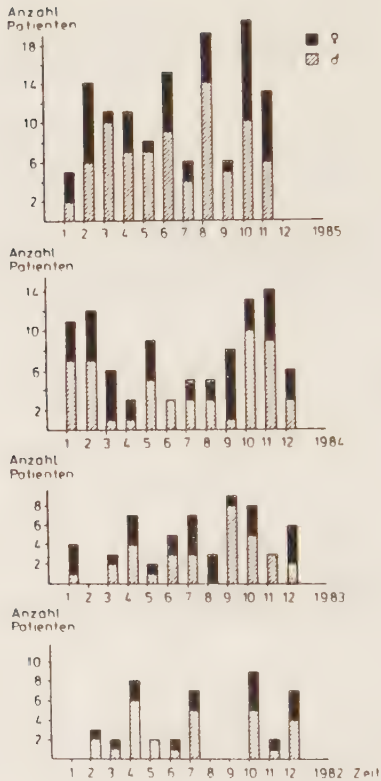


Abb. 19 Zeitliche Darstellung der Anzahl der Patienten mit V.a. Sarkoidose
 Gesamthöhe der Säulen = Gesamtzahl der untersuchten Patienten
 Schraffiert = Männer
 Dunkel = Frauen

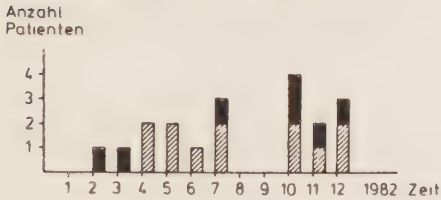
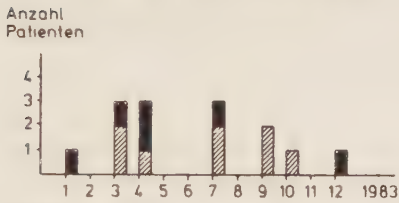
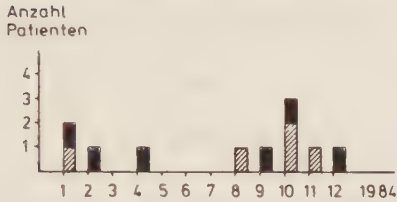
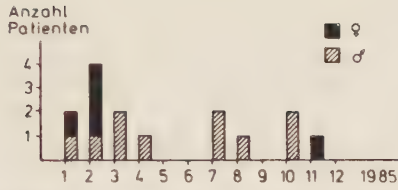


Abb. 20 Zeitliche Darstellung der Anzahl der Patienten mit erhöhten Serum-ACE-Aktivitäten ($>10,4 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}$)
 Gesamthöhe der Säulen = Gesamtzahl der untersuchten Patienten
 Schraffiert = Männer
 Dunkel = Frauen

3.3.5.1. Mittelwerte der prozentualen in vitro-Hemmung

Für alle erfaßten Patienten konnte für die verwendete Inhibitorkonzentration (54,8 nmol/ml) ein Mittelwert von $95,58 \% \pm 3,44 \text{ SD}$; ($n = 326$) berechnet werden.

Für Männer betrug die Hemmung

$95,81 \% \pm 3,23 \text{ SD}$; ($n = 196$), für Frauen $95,29 \% \pm 3,71 \text{ SD}$; ($n = 130$). Ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich nicht nachweisen.

3.3.5.2. Prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Höhe der Serum-ACE-Aktivität

In Abbildung 21 ist die prozentuale Inhibition in Abhängigkeit von der Höhe der Plasma-Enzymaktivität dargestellt.

Mit zunehmender Enzymaktivität steigt auch die Hemmung an.

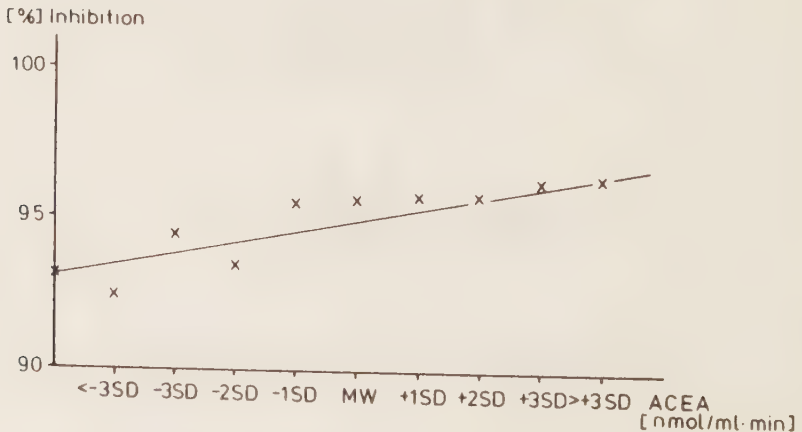


Abb. 21 Prozentuale Hemmung der Serum-ACE-Aktivität in Abhängigkeit von der Höhe der Enzymaktivität

3.4. Auftrennung der Serum-ACE-Aktivität mit Hilfe der Sephadex-Säulen-Chromatographie

3.4.1. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität (Aktivitätsspektren) gesunder Probanden

Es wurden Seren von 16 gesunden Probanden, neun Männern und sieben Frauen, im Alter zwischen 24 und 60 Jahren untersucht. Die Ergebnisse der Sephadex-Gelfiltrationen an dem Gel G-200 sind den folgenden Abbildungen 22 - 37 zu entnehmen. Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen, dem jeweils ein bestimmtes Molekulargewicht zugeordnet werden kann, aufgetragen, auf der linken Ordinate die gemessene ACE-Aktivität des Eluats und auf der rechten die Extinktion für die Wellenlänge 280 nm, als Maß der Proteinkonzentration.

Übereinstimmend läßt sich in allen Diagrammen eine große Bande mit aufgesetzter Feinstruktur im Molekulargewichtsbereich 135 000 - 500 000 erkennen. Außerdem wurden zwei weitere Banden mit deutlich geringerer Aktivitätshöhe für kleinere Molekulargewichtsbereiche gefunden.

3.4.2. Molekulargewichtsbereiche der Serum-Enzyme gesunder Probanden

In Tabelle 11 wird die Feinstruktur der ersten großen Aktivitätsbande, die regelmäßig an der aufsteigenden Flanke des zweiten Proteingipfels erscheint, nach Molekulargewichten geordnet, wiedergegeben. In der Übersicht erfolgte eine Unterteilung in fünf Molekulargewichtsbereiche, die fünf beobachteten aufgesetzten Spitzen entsprechen. Die gemittelten Molekulargewichtsbereiche betrugen 478 000 $\pm$ 34 000 (SD), 350 000 $\pm$ 25 000 (SD), 281 000 $\pm$ 14 000 (SD), 223 000 $\pm$ 16 000 (SD) und 150 000 $\pm$ 21 000 (SD).

Der zweite Hauptpeak setzt bei etwa 62 000 ein und läuft dann langsam aus. Dieser Gipfel ist in der Regel nicht weiter unterteilt. Nur bei drei Probanden ist eine kleine aufgesetzte Zacke erkennbar (Tabelle 12).

Der dritte Hauptgipfel liegt außerhalb des Eichbereiches der Säule, tritt jedoch nahezu konstant bei allen Probanden im selben Elutionsbereich auf (Tabelle 12).

3.4.3. Aktivitätsmittelwerte der Einzelbanden

Für die in den Tabellen 11 und 12 genannten Molekulargewichtsbereiche wurden die Mittelwerte der Enzymaktivitäten für die Gesamtheit der Probanden sowie für Männer und Frauen getrennt ermittelt. Diese Werte sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Es ist klar ersichtlich, daß die Banden der Molekulargewichtsbereiche 250 000 - 300 000 und 200 000 - 250 000 stärker bei den Frauen als bei den Männern ausgebildet sind. Die mittlere Enzymaktivität der Bande im Bereich 400 000 - 550 000, die mit einer Ausnahme nur bei Männern gefunden wurde, beträgt $11,29 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}^{-1} \pm 1,89 \text{ (SD)}$.

3.5. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität (Aktivitätsspektren) anephrischer Patienten

Es wurden mittels einer Sephadex-Gelfiltration die Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität vier anephrischer Patienten bestimmt. Das Verhalten der Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen im Eluat ist in den Abbildungen 38 - 41 dargestellt. Die ermittelten Molekulargewichtsbereiche für die aufgetrennten Banden sowie die gemittelten Aktivitäten der einzelnen Maxima sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Für alle bilateral nephrektomierten Patienten (drei Frauen, ein Mann), konnte übereinstimmend eine Bande im Molekulargewichtsbereich 400 000 - 575 000 ermittelt werden.

Bande I

Pro-band	Alter	MG 400 000 - 550 000	MG 300 000 - 400 000	MG 250 000 - 300 000	MG 200 000 - 250 000	MG 100 000 - 200 000	Anzahl der Maxima
P.C. U.L. K.K. E.T. F.G. C.A. E.H. H.D. G.W.	40 60 50 25 26 26 32 53 34	512758 424544 478966 332963 348446 381603 318169 381603	332963	290523 277615 253493 265280 290523 290523	201963 231467 211354 211354 242229	184415 168391 134161 146927	3 3 3 3 3 3 3 2
MW ₂ SD ₂	38,4 -13,1	472681 + 36359	349291 + 26797	277992 + 17703	219674 + 16582	158473 + 22328	2,78 +0,44
P.D. H.S. L.O. C.F. B.D. S.S. I.M.	27 46 48 44 50 28 30	501237	370916 332963	298670	242229	128200 134161 153759	2 2 1 2 1 2 2
MW ₂ SD ₂	39,0 +10,2	501237	351939 + 26836	286900 + 10745	229711 + 15716	138706 + 13372	1,7 +0,49
C ² +C ² MW	38,3 +11,5	478392 + 33879	349953 + 24846	280961- + 14241	223437 + 15716	150002 + 20506	2,3 +0,70
Zahl d. Maxima C ² :C ²	4:1	6:2	6:3	5:3	4:3		

Tab. 11 Feinstruktur der Aktivitätsbande I - Molekulargewichtsbereiche

Pro-band band	MG 40 000 - 65 000	MG 20 000 - 40 000	MG 10 000 - 20 000	Anzahl der Maxima	MG 2 000 - 3 000	MG 1 000 - 2 000	MG 1 000	Anzahl der Maxima
C ^A								
P.C.		31332		1	2574	1708	980	3
U.L.	49360	28850		2		1243		1
K.K.			17353	1		1036	657	2
E.T.	64835			1	2244			1
F.G.		29940		1			990	1
C.A.		26124		1			864	1
E.H.		39326		1				1
H.D.		28610		1		1188		1
G.W.	40197	28610		2	2573	1300		1
MwC ^A		30398				1986		2
SD ^A	51464 + 12453	+ 4239	17353	1,22 ± 0,44	2463 ± 290	1410 ± 360	872 + 154	1,44 ± 0,73
P.D.	61954			1		1084		1
H.S.		26124		1	2458			1
L.O.		32789	17353	2		1491		1
C.F.		24640	11578	2		1788	688	2
B.D.		37579		1		1361		1
S.S.		28610		1			980	1
I.M.		31332		1		1788		1
MwS	61954	30179	14465	1,28 ± 0,49	2458	1502 ± 299	834 ± 206	1,14 ± 0,37
SD ^A		+ 4743	+ 4083					
C ^A + Y								
Mw		30297	15428	1,25 ± 0,45	2462 ± 155	1452 ± 321	859 ± 152	1,31 ± 0,60
SD	54086 + 114400	- 4286	- 3334					
Zahl d. Maxima								
C ^A : P	3:1	7:6	1:2		3:1	6:5	4:2	

Tab. 12 Feinstruktur der Aktivitätsbande II

Feinstruktur der Aktivitätsbande III

- Molekulargewichtsbereiche -

Proband	Serum (ml)	Bande I			4	5	Bande II			Bande III		
		1	2	3			1	2	3	1	2	3
α_1												
P.C.	2,0	12,66	12,54			6,49		0,83		0,99	0,85	1,04
U.L.	2,0	9,00		8,76		7,73		0,74			0,94	
K.K.	1,8			11,16		7,79	0,75				1,09	1,02
E.T.	2,0	13,02	5,22		12,22		1,09		0,96			
F.G.	2,0		9,12	8,04	1,39					0,68		
C.A.	1,75	10,50	7,43		3,75	5,26		0,70				0,54
E.H.	2,0		8,33	6,17	6,21			0,85			0,97	1,03
H.D.	2,2		7,37	12,91				0,23			0,87	
G.W.	1,6		20,50	18,79			1,33	1,24		1,25		
α_2												
Mw	11,29	10,52	10,05	7,30	6,82	1,06	0,72	0,96	0,97	0,95	0,91	
SD	$\pm 1,89$	$\pm 5,44$	$\pm 4,50$	$\pm 5,10$	$\pm 1,03$	$\pm 0,29$	$\pm 0,32$	-	$\pm 0,29$	$\pm 0,09$	$\pm 0,25$	
α_3												
P.D.	2,0		10,98	12,01		0,54		1,24		0,84		
H.S.	2,0		8,99	6,01				0,24			0,95	
L.O.	1,9				12,05			0,81	0,68			
C.F.	2,0	19,75		17,52		13,11		0,56	0,79		1,53	0,90
B.D.	1,9				10,73	7,62		0,56			0,80	
S.S.	2,0			16,47	18,24			0,35				0,74
I.M.	2,0										0,67	
α_4												
Mw	19,75	10,00	13,00	13,67	10,37	0,54	0,62	0,74	0,84	0,93	0,82	
SD	-	$\pm 1,40$	$\pm 5,24$	$\pm 4,00$	$\pm 3,88$	-	$\pm 0,36$	$\pm 0,08$	-	$\pm 0,35$	$\pm 0,10$	
α_5												
Mw	12,99	10,39	11,23	9,68	8,00	0,92	0,67	0,81	0,94	0,94	0,88	
SD	$\pm 4,12$	$\pm 4,64$	$\pm 4,81$	$\pm 5,51$	$\pm 2,69$	$\pm 0,35$	$\pm 0,32$	$\pm 0,14$	$\pm 0,24$	$\pm 0,24$	$\pm 0,20$	

Tab. 13 Aktivitätsmittelwerte der Einzelbanden [nmol/ml · min]

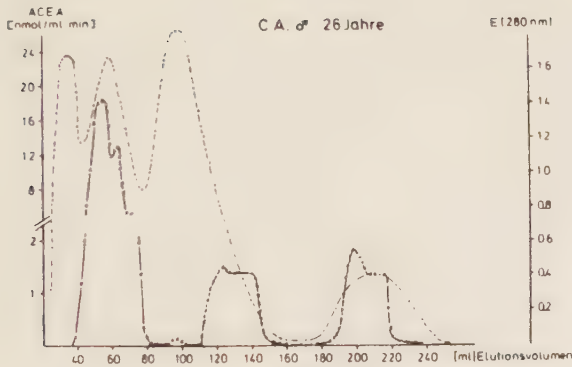


Abb. 22 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,3 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 190 Fraktionen bestimmt.

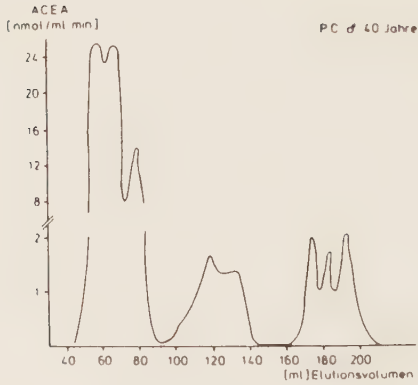


Abb. 23 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,4 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 150 Fraktionen bestimmt.

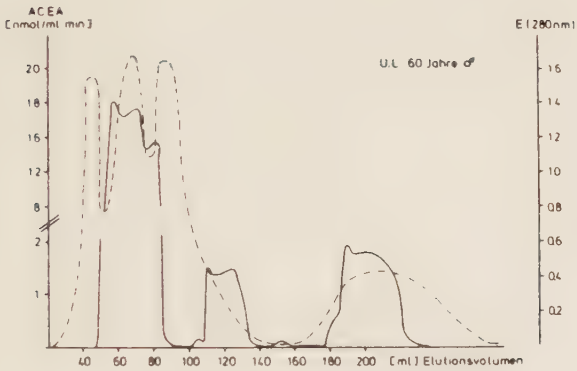


Abb. 24 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,3 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 185 Fraktionen bestimmt.

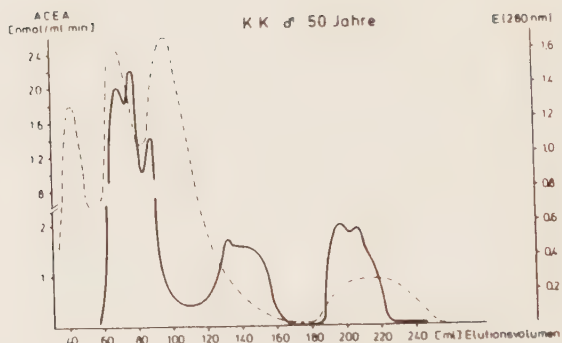


Abb. 25 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.

Aufgetragenes Serumvolumen: 1,8 ml

Fraktionsvolumen: 1,7 ml

ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 150 Fraktionen bestimmt.

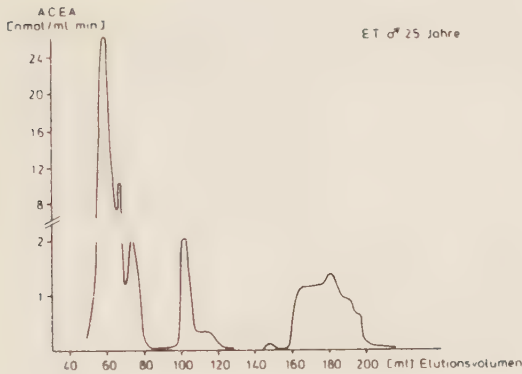


Abb. 26 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.

Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml

Fraktionsvolumen: 1,7 ml

ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion

wurden in jeder der etwa 130 Fraktionen bestimmt.

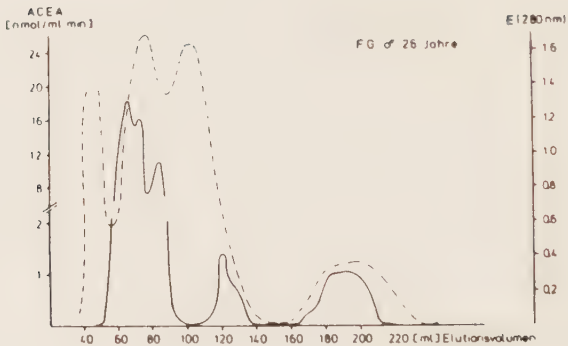


Abb. 27 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,4 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 170 Fraktionen bestimmt.

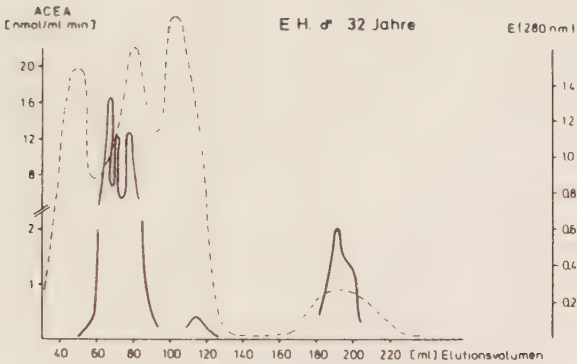


Abb. 28 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,8 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 135 Fraktionen bestimmt.

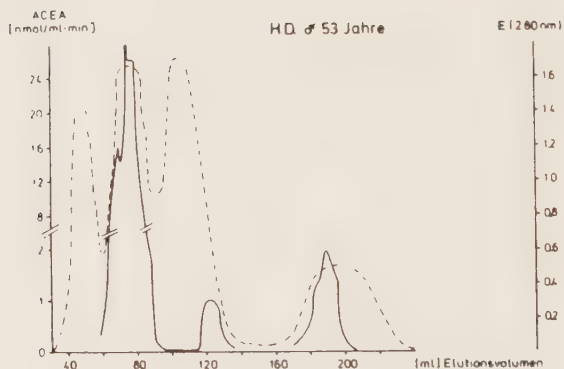


Abb. 29 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums
von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,2 ml
Fraktionsvolumen: 2,5 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion
wurden in jeder der etwa 100 Fraktionen bestimmt.

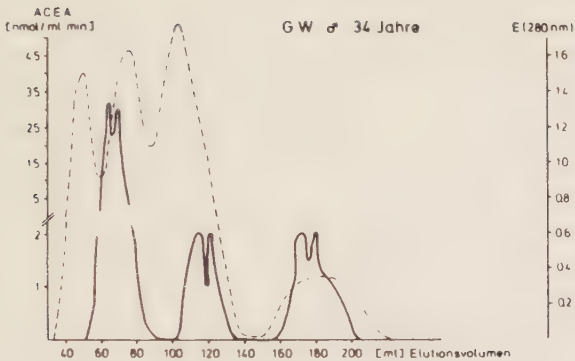


Abb. 30 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums
von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 1,6 ml
Fraktionsvolumen: 1,5 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion
wurden in jeder der etwa 140 Fraktionen bestimmt.

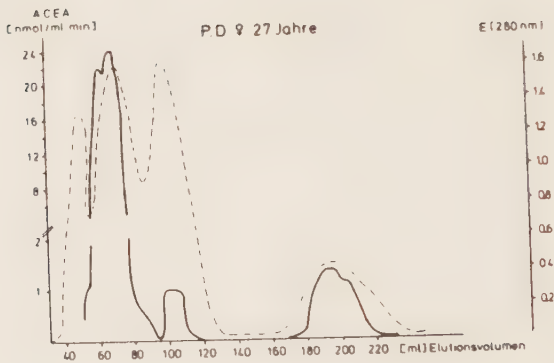


Abb. 31 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,6 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 150 Fraktionen bestimmt.

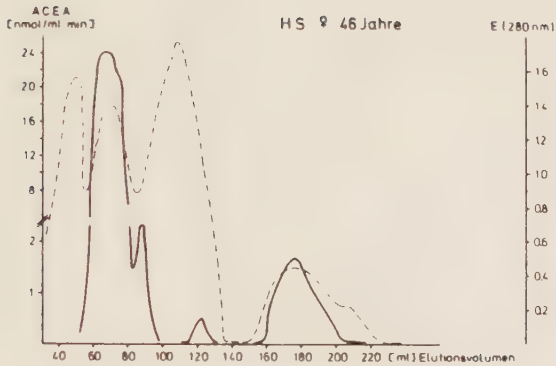


Abb. 32 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 2,2 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 105 Fraktionen bestimmt.

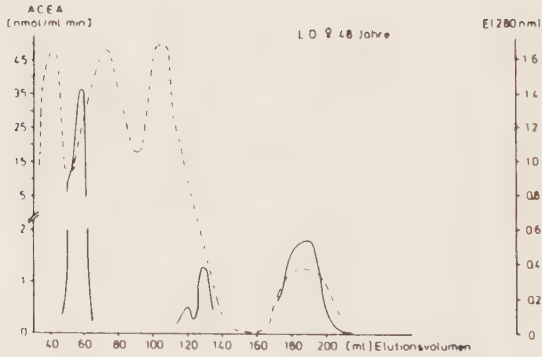


Abb. 33 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 1,9 ml
Fraktionsvolumen: 1,4 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 150 Fraktionen bestimmt.

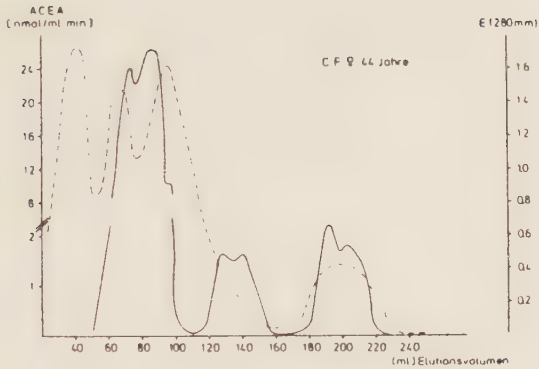


Abb. 34 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,6 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 145 Fraktionen bestimmt.

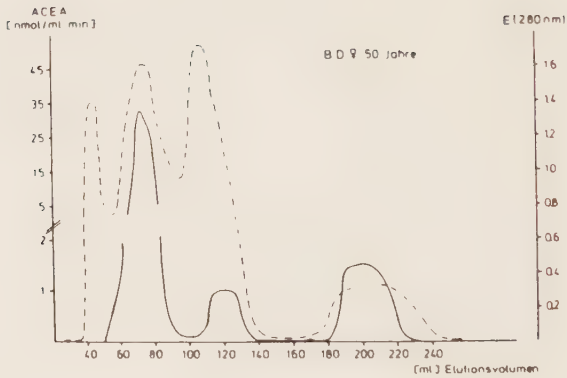


Abb. 35 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 1,9 ml
Fraktionsvolumen: 1,4 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 170 Fraktionen bestimmt.

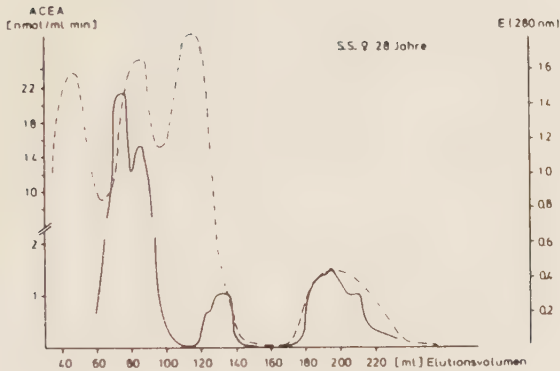


Abb. 36 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,6 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 140 Fraktionen bestimmt.

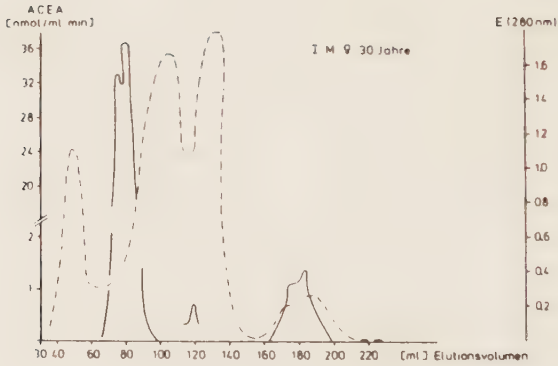


Abb. 37 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem gesunden Probanden.
Aufgetragenes Serumvolumen: 2,0 ml
Fraktionsvolumen: 1,5 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 150 Fraktionen bestimmt.

Patient	Bande I		Bande II		Bande III		Serum (ml)
	MG	400 000 - 575 000	300 000 - 400 000	400 000 - 85 000	4 000 - 5 000	2 000 - 3 000	
1 ♂		574 459	332 963	61 954		2 948	1,15
2 ♀		548 934		85 161	4 438		1,05
3 ♀		478 966		74 306		2 349	1,20
4 ♀				81 377	4 238	2 857	0,95
♂ + ♀							
Mw	517 046	332 963		75 699	4 338	2 775	1 651
SD	±52 872	-		±10 208	± 141	± 287	± 494
	ACEA	ACEA	ACEA	ACEA	ACEA	ACEA	ACEA
1 ♂		2,17	3,46	0,49		1,2	
2 ♀		3,95		2,95	2,26		
3 ♀		4,04		2,11		1,67	1,53
4 ♀		4,80		5,77	1,03	1,72	1,63
♂ + ♀							
Mw	3,74	3,46			1,65	1,53	1,58
SD	±1,12	-		±2,21	±0,89	±0,29	±0,07

Tab. 14 Feinstruktur und mittlere ACE-Aktivitäten
der Banden I - III anephrischer Patienten.

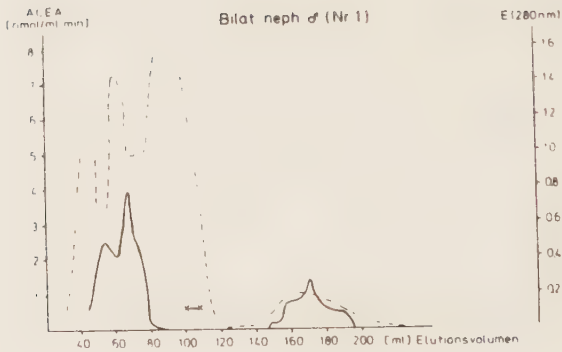


Abb. 38 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem bilateral nephrektomierten Patienten.
 Aufgetragenes Serumvolumen: 1,15 ml
 Fraktionsvolumen: 1,40 ml
 ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 160 Fraktionen bestimmt.

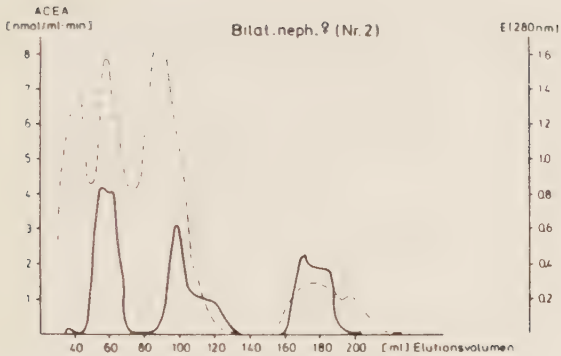


Abb. 39 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem bilateral nephrektomierten Patienten.
Aufgetragenes Serumvolumen: 1,05 ml
Fraktionsvolumen: 1,6 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 130 Fraktionen bestimmt.

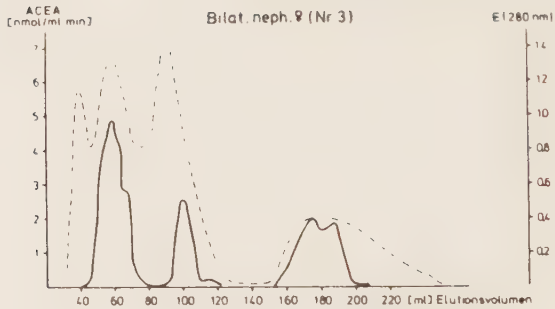


Abb. 40 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem bilateral nephrektomierten Patienten.
Aufgetragenes Serumvolumen: 1,20 ml
Fraktionsvolumen: 1,50 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 160 Fraktionen bestimmt.

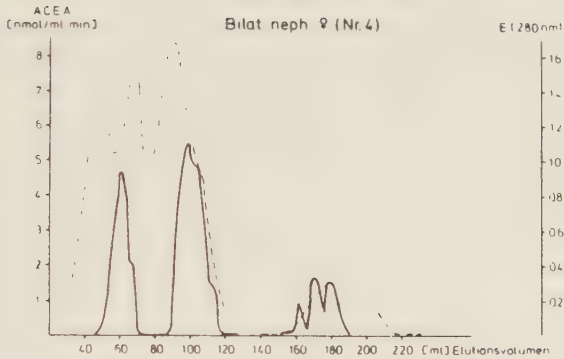


Abb. 41 Ergebnis der Sephadex-Gelfiltration eines Serums von einem bilateral nephrektomierten Patienten.
Aufgetragenes Serumvolumen: 0,95 ml
Fraktionsvolumen: 1,30 ml
ACE-Aktivität, Elutionsvolumen und Extinktion wurden in jeder der etwa 170 Fraktionen bestimmt.

4. DISKUSSION

4.1. Vergleich von drei Methoden zur Aktivitätsbestimmung des ACE im menschlichen Serum

Zu Beginn dieser Untersuchungen standen hauptsächlich drei Verfahren zur Aktivitätsbestimmung des ACE im menschlichen Serum zur Auswahl. Es sollten nun Vor- und Nachteile dieser Analysetechniken herausgefunden und diskutiert werden. Im Vordergrund standen die Fragen, welches Verfahren für die routinemäßige Messung von menschlichen Serumaktivitäten am besten geeignet ist und mit welchem die kleinsten Enzymaktivitäten erfaßbar sind. Die letzte Frage ist von Bedeutung für die Messung im Liquor, in kleinen Gewebestrukturen und insbesondere im aufgetrennten Serum zur Identifizierung von Isoenzymen.

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß sieben der mit der spektralphotometrischen Methode bestimmten Enzymaktivitäten oberhalb oder in unmittelbarer Nähe der oberen 2 SD-Grenze des Normalbereichs gesunder Probanden liegen ($= 10,40 \text{ nMol/ml} \times \text{min}$). Die restlichen Meßwerte sind weniger als eine Standardabweichung vom Mittelwert entfernt. Die höchsten Enzymaktivitäten wurden übereinstimmend mit allen drei Methoden für die Patienten Sch. und Hi. ermittelt. Den niedrigsten Meßwert bestimmten wir ebenfalls in Übereinstimmung für den Patienten E.

Werden die einzelnen Meßwerte für die Methoden getrennt nach Größe geordnet, so ist die Plazierung für 9 Patienten bei mindestens zwei Methoden gleich. Die Übereinstimmung war hierbei eher für das radiochemische und fluorimetrische Meßverfahren gegeben. So ergab sich auch der höchste Korrelationskoeffizient (0,963) beim Vergleich dieser beiden Methoden. Dieser Wert ist noch etwas höher als der von Ryan (125, 162) angegebene. Die beiden anderen Korrelationskoeffizienten (radiochemische/ spektralphotometrische und spektralphotometrische/ fluorimetrische Methode) sind etwas niedriger (0,770 bzw. 0,817). Am geringsten ist der Wert beim Vergleich des

spektralphotometrischen Verfahrens mit dem radiochemischen. Mit der fluorimetrischen Methode können aufgrund der hohen Ausgangsverdünnung (ca. 1:500) die niedrigsten ACE-Aktivitäten erfaßt werden, was sich jedoch als Nachteil für die Messung von Serumaktivitäten erweist. Für die Messung von Mikroaktivitäten eignet sich auch das radiochemische Verfahren noch recht gut. Bei nicht zu niedrigen ACE-Aktivitäten erwies sich die radiochemische Nachweismethode als sehr vorteilhaft. Sie ist schneller und einfacher durchzuführen, und die Meßergebnisse sind etwas besser reproduzierbar, jedoch wirkt sich der Preis und die Beseitigung der radioaktiven Abfälle nachteilig aus.

Für diese Untersuchungen läßt sich die Intra- und Interassaystreuung nur abschätzen. Als Variationskoeffizient wurde dabei für Wiederholungsmessungen an verschiedenen Tagen (Interassayvariationskoeffizient) für die radiochemische Methode ein Wert von 5 % ermittelt. Für das fluorimetrische Verfahren läßt sich ein mittlerer Variationskoeffizient zwischen 5 und 10 % errechnen. Die relative Standardabweichung für Mehrfachmessungen innerhalb einer Meßreihe (Intraassayvariationskoeffizient) kann bei allen Methoden unterhalb 5 % angenommen werden.

Zur Bestimmung der ACE-Aktivität im menschlichen Serum sind prinzipiell alle drei Techniken geeignet. Außerdem zeigte die Messung mit verdünnten Seren, daß höhere Werte am genauesten mit der radiochemischen Methode erfaßt werden können. Bei den spektralphotometrischen und fluorimetrischen Verfahren kann das Ergebnis durch Trübung oder Eigenfärbung des Serums beeinflußt werden. Bei der Verwendung dieser Methoden ist es daher günstig, eine Messung in Gegenwart eines ACE-Inhibitors zusätzlich durchzuführen. Auf diese Weise können störende Einflüsse wie Trübung oder Eigenfärbung eliminiert werden.

Aufgrund dieser Untersuchungen stellt sich heraus, daß die bisher von uns verwandte spektralphotometrische Methode, die ursprünglich von Cushman und Cheung entwickelt (27) und später von Lieberman (74) modifiziert wurde, am günstigsten geeignet zu sein scheint. Für diese Entscheidung spricht auch, daß dieses Verfahren international am meisten eingesetzt wird. Das Erlernen dieser Methode ist einfacher als das des fluorimetrischen Verfahrens. Außerdem ist die Meßgenauigkeit besser.

4.2. Untersuchungen über Stabilität des Serum-ACE und die Meßgenauigkeit (Interassay- und Intraassayvariationskoeffizienten) der Lieberman-Methode

4.2.1. Stabilitätsverhalten des Serum-ACE während der Aufbewahrung im gefrorenen Zustand (-18° C)

Zur Verbesserung der Meßgenauigkeit empfiehlt es sich, in jede Meßreihe Proben mit bekannter ACE-Aktivität einzuschließen und mit deren Hilfe einen Korrekturfaktor zu bestimmen.

Die Untersuchungen zeigen, daß bei Verwendung derartiger Mischseren das zeitliche Verhalten der Enzymaktivität berücksichtigt werden sollte. Über längere Zeiträume ist eine (geringe) Inaktivierung zu erwarten. Bei dem Mischserum I ist möglicherweise eine Enzymaktivierung wirksam. Ein Anstieg der Enzymaktivität nach einer Aufbewahrung im gefrorenen Zustand wurde auch von Pietilö (99) beobachtet. Für das Renin, einem anderen Enzym des RAS, wurde eine Kryoaktivierung schon früher beschrieben (12).

Mit Hilfe der Mischseren konnten die Interassayvariationskoeffizienten der ACE-Aktivitäten ermittelt werden.

4.2.2. Interassayvariationskoeffizient der Endwerte

Der Interassayvariationskoeffizient beträgt nur 7,3 %

und liegt damit im üblichen Bereich derartiger Enzymaktivitätsmessungen (112). Es ist jedoch ratsam, zur Verbesserung der Meßgenauigkeit das zeitliche Verhalten der Enzymaktivitäten der gelagerten Mischseren (Standards) zu berücksichtigen.

4.2.3. Interassayvariationskoeffizienten der Zwischenwerte (Meß- und Leerwerte)

Für die Meßgenauigkeit ist die exakte Ermittlung der Leerwerte von großer Bedeutung. Diese Fehlerquelle spielt besonders bei niedrigen ACE-Aktivitäten eine Rolle. Eigenfärbungen und Trübungen der Seren führen zu fehlerhaften Werten. Wichtig ist außerdem die sorgfältige Reinigung der verwendeten Küvetten nach jeder Messung. Um zu klären, inwieweit die Streuung der Endergebnisse von den Zwischenwerten abhängig ist, wurden auch die Variationskoeffizienten für Meß- und Leerwerte der Proben errechnet. Aus der Tabelle 9 ist ersichtlich, daß die Variationskoeffizienten der Leerwerte ausnahmslos größer sind als die der Meßwerte.

Auch aus diesem Grunde empfiehlt es sich, neben den Leerwerten Inhibitorwerte zusätzlich mitzumessen. Dieses setzt jedoch voraus, daß die Aktivität gleichmäßig gehemmt wird. Eine vollständige Hemmung ist dabei nicht zu erwarten. Es konnte im Mittel $95,6 \% \pm 3,4$ (SD), ($n = 84$) der ACE-Aktivität inhibiert werden. Über das Ausmaß der Hemmbarkeit wird an anderer Stelle berichtet.

4.2.4. Intraassayvariationskoeffizienten der Meßwerte

Die vorliegenden Untersuchungen mit den Mischseren lassen auch eine Aussage über das Verhalten des Intraassayvariationskoeffizienten zu. Es wurden die Werte jedoch nur für die Extinktionen der Meßwerte ohne Berücksichtigung der Leerwerte

berechnet. Der Intraassayvariationskoeffizient ist 1,4 % für Mischserum I, 2,0 % für Mischserum II und 2,0 % für Mischserum III ($MW = 1,8 \% \pm 0,3 \text{ SD}$; $n = 178$). Er beträgt damit nur 25 % des bestimmten Interassayvariationskoeffizienten.

4.2.5. Streubreite der Leerwerte

Für die Leerwerte wurde anstelle eines Intraassayvariationskoeffizienten die mittlere Abweichung vom Mittelwert berechnet, da nur Doppelwerte bestimmt wurden. Die Leerwerte des Mischserums I fanden für die Berechnung Verwendung. Insgesamt konnten 124 Leerwerte doppelt erfaßt werden. Die mittlere prozentuale Abweichung vom Mittelwert für die Doppelbestimmungen betrug 4,4 %, so daß der Intraassayvariationskoeffizient des Leerwertes im Bereich zwischen 1,4 und 4,4 %, d.h. unter 5 % anzunehmen ist.

Der Intraassayvariationskoeffizient der Leerwerte ist damit - wie zu erwarten - deutlich niedriger als der entsprechende Interassayvariationskoeffizient. Allerdings sollte auch in diesem Fall die Veränderung der Enzymaktivität während der Lagerung der Seren Berücksichtigung finden, was zu einer Verminderung des Interassayvariationskoeffizienten führen würde.

4.2.6. Überprüfung der Meßwerte auf Normalverteilung nach Gauß

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung einer Meßmethode ist die Überprüfung der Meßwerte auf Normalverteilung nach Gauß (108). Im Mittel konnten die von Gauß angegebenen Werte (108) für das Vorliegen einer Normalverteilung erreicht werden, obwohl bei diesen Berechnungen das zeitliche Verhalten der Serum-ACE-Aktivität nicht berücksichtigt wurde. Lediglich bei zwei Einzelwerten wurden Abweichungen von 0,88 bzw. 2,1 % festgestellt (Tabelle 10).

4.2.7. Korrekturfaktor

Die Berücksichtigung der mit Hilfe der Mischseren bestimmten Standardwerte erfolgt mit einem Faktor, der für jede MeBreihe berechnet wird. Dabei gilt der Mittelwert aller bisher für das betreffende Mischserum berechneten Ergebnisse als Richtwert. Mit dem Faktor werden die Aktivitätswerte korrigiert.

Nachfolgend ist der für das als Standard verwendete Mischserum I gemittelte Faktor mit Standardabweichung angegeben:

$$F = 1,0097 \pm 0,074 \text{ SD; } n = 62.$$

Der dafür berechnete Variationskoeffizient beträgt 7,4 % und liegt in der Nähe des für diese Methode ermittelten Interassayvariationskoeffizienten (6,4 %).

4.3. Meßergebnisse der ACE-Aktivitätsbestimmung im Serum der Patienten

4.3.1. Normalbereich der ACE-Aktivität im menschlichen Serum

Von Lieberman wird als Normalbereich für die ACE-Aktivität im menschlichen Serum $7,60 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 2,01 \text{ (SD)}$ angegeben (74). Dieser Autor ermittelte für männliche Probanden einen statistisch signifikant höheren Wert als für weibliche. Auch für Ratten konnte eine gleichartige Geschlechtsabhängigkeit der Serum-ACE-Aktivität festgestellt werden (111). Da die höchsten spezifischen ACE-Aktivitäten des Organismus in Hoden und Nebenhoden sowie im Seminalplasma enthalten sind (55, 123), stellt sich die Frage, ob der Geschlechtsunterschied der Enzymaktivitäten nicht durch einen Anteil bedingt ist, der dem männlichen Genitaltrakt entstammt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte auch ein Beitrag zur Klärung dieser Frage geleistet werden.

Der von Lieberman angegebene Normalbereich (74) wird durch eine frühere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Für 32 gesunde Probanden beiderlei Geschlechts wurde als Mittelwert der Serum-ACE-Aktivität $7,64 \text{ nmol} \pm 1,38 \text{ (SD)}$ ermittelt. Rodriguez (115) untersuchte ACE-Plasma-Spiegel bei gesunden Kindern in Abhängigkeit vom Alter. Er fand, daß etwa 40 % der untersuchten Kinder ACE-Aktivitäten über dem 2 SD-Bereich der Erwachsenen hatten. Bis zum Alter von 15 Jahren konnte keine Altersabhängigkeit und außerdem kein Geschlechtsunterschied festgestellt werden.

4.3.1.1. Gemittelte Serum-ACE-Aktivität der Patienten

mit Enzymwerten im Normalbereich ($7,64 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 2 \text{ SD}$)

Von den 326 Patienten lagen 196 gemäß ihrer Serum-ACE-Aktivität

im Normalbereich. Als Mittelwerte wurden
7,21 nmol/ml · min $\pm$ 1,54 (SD) insgesamt, für Männer
7,44 nmol/ml · min $\pm$ 1,62 (SD) und für Frauen
6,93 nmol/ml · min $\pm$ 1,39 (SD) berechnet. Die ACE-Aktivität
der Männer unterschied sich statistisch signifikant von der
der Frauen (p : 0,025).

Die Abweichung dieses Mittelwertes von dem der gesunden Probanden
beträgt 5,6 % und liegt damit im Bereich des Interassay-
variationskoeffizienten (112). Es ist zu berücksichtigen, daß
in dem Patientengut Erkrankte enthalten sind, deren
ACE-Aktivität durch Corticoidbehandlung supprimiert wurde.
Ebenso sind wahrscheinlich Patienten mit pathologisch
erniedrigter Enzymaktivität darunter. Auch aufgetrennt nach
Männern und Frauen ergaben sich für das betrachtete
Patientengut erniedrigte Werte, nämlich um 7,8 bzw. 3,9 %.

4.3.1.2. Mittelwert der Serum-ACE-Aktivitäten aller Patienten

Wird die mittlere Enzymaktivität für die Gesamtzahl der
Patienten ($n = 326$) gebildet, so erhält man
7,47 nmol/ml · min $\pm$ 3,47 SD; $n = 326$, für Männer
7,73 nmol/ml · min $\pm$ 3,65 SD; $n = 194$ und für Frauen
7,10 nmol/ml · min $\pm$ 3,16 SD; $n = 132$. Auch in diesem Fall
wurden für Männer erhöhte Enzymaktivitäten festgestellt,
jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant.
Dieses ist wahrscheinlich auf die relativ große Streuung
der Meßwerte zurückzuführen; der Variationskoeffizient
beträgt 47,0 % bzw. 44,4 %.

4.3.2. Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitäten

4.3.2.1. Gesamtes Patientengut

Am häufigsten wurden Enzymaktivitäten im Bereich zwischen

5 und 7 nmol/ml · min ermittelt (Abbildung 12). Diese Aktivitäten liegen im unteren Normalbereich der gesunden Probanden. Das mag daran liegen, daß die Zahl der mit Corticoiden behandelten Patienten und dadurch supprimierten Enzymaktivitäten stärker ins Gewicht fällt als die mit erhöhten Serum-ACE-Spiegeln.

Andererseits wurde von Schweisfurth für nüchterne Probanden nach mehrstündiger Bettruhe eine kleinere Serum-ACE-Aktivität gemessen als die, die von Lieberman (74) angegeben wurde (150).

4.3.2.2. Einteilung in Männer und Frauen

Werden die ermittelten Ergebnisse auf die Gesamtanzahl aller untersuchten Männer oder Frauen bezogen, so ergeben sich für 12,2 % der Männer und für 9,8 % der Frauen pathologische Enzymaktivitäten.

Ewert (40) gab für die Krankenanstalten Höchenschwand ein Verhältnis an (50,05 % Männer, 49,95 % Frauen), das in etwa dem natürlichen Geschlechtsverhältnis entspricht. In einer weltweiten Studie stellte James (61) ebenfalls eine ausgeglichene Geschlechtsverteilung für Weiße fest. Bei schwarzen Patienten fand er, daß Frauen etwa doppelt so häufig an Sarkoidose erkranken wie Männer.

Da in vorliegendem Patientengut weniger Frauen als Männer enthalten sind, kann angenommen werden, daß die Sarkoidose bei den Frauen teilweise klinisch nicht erfaßt wird.

Wenn man davon ausgeht, daß pro Jahr 5 000 - 6 000 Neuerkrankungen für die BRD geschätzt werden (171), dann ist sicherlich die Zahl der Sarkoidosefälle im Einzugsgebiet des Klinikums größer als durch das vorliegende Untersuchungsmaterial zum Ausdruck kommt.

4.3.3. Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten

4.3.3.1. Gesamtes Patientenkollektiv

Die Daten zeigen, daß am häufigsten Patienten im Alter zwischen 25 und 36 Jahren untersucht wurden.

Nach Wurm wird die Sarkoidose insbesondere zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr beobachtet (40).

4.3.4. Mittlere Enzymaktivität

4.3.4.1. In Abhängigkeit vom Lebensalter

Eine Altersabhängigkeit der erkrankten Patienten mit erhöhter Serum-ACE-Aktivität ist aus Diagramm 16 nicht zu erkennen. Dies mag daran liegen, daß die Zahl der Patienten mit pathologisch erhöhten Werten relativ klein ist. Bei der Gesamtzahl der untersuchten Erkrankten wirken sich diese kaum auf den Mittelwert aus. Die durchschnittliche Enzymaktivität des gesamten Kollektivs beträgt $7,47 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 3,47 \text{ SD}$, ($n = 326$).

4.3.4.2. In Abhängigkeit vom Geschlecht

Abbildung 17 kann entnommen werden, daß eine große Zahl der Patienten mit erhöhten ACE-Aktivitäten den Jahrgängen 1947 - 60 angehört.

Da Wurm (40) bei Frauen zwei Maxima ermittelte, wurden die Ergebnisse für Männer und Frauen getrennt aufgetragen (Abbildung 18).

Bei den Männern ließen sich erhöhte Enzymaktivitäten hauptsächlich für die Jahrgänge 1945 - 47 feststellen. Jedoch sind zwei weitere kleinere Maxima bei 1956 - 61 und 1938 - 43 erkennbar.

Bei den Frauen hingegen ist nur ein Maximum deutlich ausgeprägt. Dieses liegt zwischen den Geburtsjahren 1953 - 64.

Das von Wurm (40) beobachtete zweite Maximum bei Frauen im klimakterischen Alter konnte für das vorliegende Patientengut nicht bestätigt werden. Dieses kann jedoch daran liegen, daß das untersuchte Kollektiv zu klein ist.

Möglicherweise ist das auch darauf zurückzuführen, daß Frauen, die zur Zeit der Untersuchung im Klimakterium waren, während des zweiten Weltkrieges geboren wurden. In dieser Zeit fand sicherlich ein Geburtenrückgang statt.

4.3.4.3. In Abhängigkeit von der Zeit der Messung (Jahreszeit- bzw. Witterungseinflüsse)

Folgend sollte geklärt werden, ob die Zahl der untersuchten Patienten und/oder der erhöhten Serum-ACE-Aktivitäten einer jahreszeitlichen Abhängigkeit unterliegen.

Die in Abbildung 19 und 20 erkennbaren Maxima für die Monate Februar/März und September/Okttober sind möglicherweise urlaubsbedingt, da die Weihnachts- bzw. Sommerferien vorangehen und die Messungen vielfach erst 14 Tage nach der Blutentnahme durchgeführt wurden. Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß Witterungseinflüsse eine Rolle spielen.

4.3.5. In vitro-Hemmung der Serum-ACE-Aktivität mit dem ACE-Inhibitor MK 422

Es gibt heute eine Reihe von ACE-Inhibitoren, die zur Therapie der arteriellen Hypertonie eingesetzt werden. Obwohl sich diese Substanzen bei der Behandlung des hohen Blutdrucks bewährt haben und sie zweifellos die Plasma-ACE-Aktivität hemmen, konnte bisher keine eindeutige Korrelation zwischen Blutdruckverhalten und ACE-Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Gewebe-ACE-Aktivität in der arteriellen Gefäßwand oder auch in der Niere beteiligt.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der in vitro-Hemmung hatten einerseits zum Ziel, die Meßergebnisse daraufhin abzusichern, daß in Gegenwart des Inhibitors keine oder nur eine geringe Enzymaktivität bestimmbar ist. Andererseits sollte geklärt werden, ob auf diese Weise das diagnostische Aussagevermögen der Aktivitätsbestimmung verbessert werden kann. Es ist nämlich denkbar, daß mit der Bestimmungsmethode, wenn auch in geringem Maße, mehrere Enzyme erfaßt werden, deren Hemmbarkeit sich von der des $\cdot$ -ACE unterscheidet. (Als $\cdot$ -ACE wurde von R. Boucher das im Plasma hauptsächlich vorkommende Enzym bezeichnet (16)).

4.3.5.1. Mittelwerte der prozentualen in vitro-Hemmung

Die verwendete Inhibitorkonzentration (54,8 nmol/ml) liegt im Sättigungsbereich, d.h. eine höhere Blockerkonzentration würde zu keiner wesentlich größeren Hemmung der Enzymaktivität führen. Möglicherweise wäre es günstiger, mit einer kleineren Inhibitorkonzentration zu arbeiten. Da der Hemmwert der Männer sich statistisch nicht von dem der Frauen unterscheidet, darf man annehmen, daß sich ein gonadaler Enzymanteil wie das restliche Plasmaenzym verhält.

Da, wie in Abschnitt 4.4. gezeigt wird, die Serum-ACE-Aktivität mehreren Enzymen zuzuordnen ist, wäre es sinnvoll, die Hemmbarkeit der ACE-Aktivität nach vorangehender Auftrennung der Serumproteine zu erfassen. Es stellt sich die Frage, ob die 5% Restaktivität nicht weniger inhibierbaren Isoenzymen zukommt.

4.3.5.2. Prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Höhe der Serum-ACE-Aktivität

Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, konnte zwischen prozentualer Hemmbarkeit und Enzymaktivität ein linearer Verlauf mit positivem Regressionskoeffizienten festgestellt werden. Daraus kann man schließen, daß die durch die Sarkoidose bedingte Aktivitätserhöhung auf ein gut hemmbares Enzym zurückgeht. Dieser Befund bestärkt außerdem die Annahme, daß ein nicht oder nur wenig hemmbares Isoenzym in den Seren enthalten ist.

Es muß jedoch festgestellt werden, daß durch die Bestimmung der Hemmbarkeit alleine noch keine Differenzierung von Serum-Isoenzym-Aktivitäten möglich ist.

4.3.6. Verhalten der Serum-ACE-Aktivitäten einzelner Patienten während der Behandlung - Kontrolle des Therapieverlaufs -

Für einige Patienten sollte das Verhalten der Enzymaktivitäten und der prozentualen ACE-Hemmung unter Berücksichtigung der klinischen Befunde und der therapeutischen Maßnahmen untersucht werden.

Bei der Patientin K.S., Sarkoidose II, gehen die klinischen Symptome, wie Müdigkeit, Gewichtsverlust und Belastungsdyspnoe, mit erhöhten Enzym-Aktivitätswerten einher (Abbildung 42). Unter Kortisonbehandlung stellt sich die ACE-Aktivität innerhalb von 6 - 8 Wochen auf ein normales Niveau ein, um dann bei fortschreitender Reduktion der Corticoiddosis wieder über den 2SD Bereich ($>10,4 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min}$) hinaus anzusteigen. Die prozentuale Hemmbarkeit sinkt unter Therapie zunächst gleichsinnig mit der ACE-Aktivität, erreicht vor dem erneuten Anstieg der Enzymaktivität unmittelbar nach Therapieabschluß ein Minimum und steigt dann mit der Converting-Enzyme-Aktivität auf erhöhte Werte an. Bei einem zweiten Rezidiv läßt sich jedoch kein Abfall der Inhibition vor Anstieg der Enzymaktivität feststellen.

Bei der Patientin I.G. mit einer nicht behandlungsbedürftigen Sarkoidose I zeigt sich nach einer Spontanremission ein über 12 Monate währrender langsamer Anstieg der prozentualen Hemmbarkeit auf 100 %, während der anfangs erhöhte Enzymspiegel auf ein normales Niveau abfällt. Mit dem erneuten Eintreten klinischer Zeichen (Belastungsdyspnoe) kommt es zu einem Abfall der Inhibition auf ein subnormales Niveau (Abbildung 43).

Die weitere Beobachtung dieses Falles wäre interessant, um zu sehen, ob das Verhalten der ACE-Inhibition vor dem Enzymaktivitätsanstieg ein Rezidiv anzeigt.

Die Patientin A.G. hat bei einer Sarkoidose II-III (Abbildung 44) eine nur leicht erhöhte Serum-ACE-Aktivität. Bei A.G. kommt es ca. vier Wochen nach Therapiebeginn zu einem Abfall des Enzymspiegels. Zwei Monate nach Therapiebeginn erreicht die Serum-ACE-Aktivität den subnormalen Bereich. Unmittelbar nach Absetzen der Corticoidmedikation treten erneut klinische Zeichen (Husten, Dyspnoe und radiologische Verdichtung) auf, wobei die prozentuale Hemmbarkeit zunächst auf 86 % absinkt um dann, zusammen mit der Enzymaktivität, auf erhöhte Werte anzusteigen. Nach etwa vier Wochen kommt es unter Therapie wiederum zu einem Absinken des Enzymwertes.

Der Patient F.S., Sarkoidose I, zeigt über einen Zeitraum von gut einem Jahr permanent pathologisch erhöhte ACE-Werte (Abbildung 45). Ein geringer Anstieg der Enzymaktivität geht mit einem kleinen Abfall der Hemmbarkeit einher.

Bei dem Patienten B.H., Sarkoidose I-II, zeigen Enzymspiegel und Inhibition unter Therapie ein gleichsinniges Verhalten (Abbildung 46). Deutlich erkennbar ist das Einsetzen des Aktivitätsabfalls mit dem Beginn der Therapie und die Abflachung mit dem Ende der Behandlung.

Es wäre sicher interessant, bei einem größeren Sarkoidose-Kollektiv Verhalten von ACE-Aktivität und prozentualer Hemmbarkeit über einen längeren Zeitraum und, wenn möglich, unter Verwendung verschiedener Inhibitorkonzentrationen, zu verfolgen.

ACE-Aktivitätsschwankungen gehen bei den betrachteten Patienten recht gut mit der verabreichten Cortisondosis einher, korrelieren jedoch weniger gut mit einigen klinischen Zeichen und dem Lysozym-Spiegel (132).

Es stellt sich die Frage, ob die ACE-Aktivität ein zu ungenauer Parameter für die Verlaufskontrolle der Sarkoidose ist oder

aber, ob die anderen Untersuchungsverfahren, wie Thorax-Röntgen-Kontrollen und Lungenfunktionsprüfungen, es nicht erlauben, so geringe Krankheitsaktivitätsveränderungen zu erfassen.

Die Literaturangaben über die Häufigkeit erhöhter Enzymspiegel während des Krankheitsverlaufes schwanken zwischen 29 und 86 % (74, 131, 8). Die relativ große Schwankungsbreite mag dadurch verursacht sein, daß therapierte Patienten mit erfaßt worden sind. Außerdem sind einige der verwendeten Methoden recht kritisch zu beurteilen.

Normale Serum-ACE-Aktivitäten können nach DeRemee bei den Stadien I (und III), inaktiven und stationären Formen der Sarkoidose, auftreten. Sie indizieren zumindest beim radiologischen Stadium I eine gute Prognose (34, 163, 8).

Unter Cortisontherapie sinkt der pathologisch erhöhte Enzymspiegel innerhalb von vier Wochen bis zu mehreren Monaten auf normale bis subnormale Werte ab (117, 163, 8, 9). Baur et al konnten zeigen, daß bei 92% ihres untersuchten Krankengutes Spontanremissionen und Remissionen unter Cortisontherapie mit einer deutlichen Abnahme der Enzymaktivität einhergingen.

Auch Rezidive können zum Teil durch regelmäßige Serum-ACE-Aktivitätskontrolluntersuchungen frühzeitig erkannt werden (8, 10).

Bei gesunden Kontrollen oder mit Glukocorticoiden behandelten Patienten mit anderen Erkrankungen konnte keine statistisch signifikante Veränderung des ACE-Plasma-Spiegels gefunden werden (117).

Es ist zu erwarten, daß durch eine Weiterentwicklung der ACE-Bestimmungsmethode der Aussagewert für Diagnostik und Therapieverlauf verbessert wird. Die Messungen der prozentualen

Hemmung der ACE-Aktivität deuten darauf hin, daß im Serum mehrere Isoenzyme enthalten sind. Eine Auftrennung dieser Enzyme und eine differenzierte Aktivitätsmessung, d.h. Aufnahme eines Aktivitätsspektrums, könnte die diagnostische und therapeutische Wertigkeit dieser Methode erhöhen.

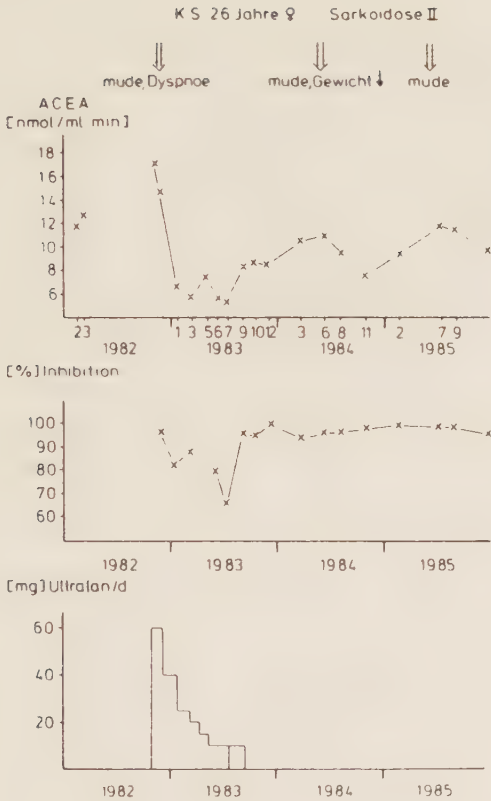


Abb. 42 Serum-ACE-Aktivität (oben), prozentuale ACE-Hemmbarkeit (mitte) und Corticoiddosis (unten) während des Behandlungszeitraumes.

J.G., 69 Jahre, ♀ Sarkoidose I

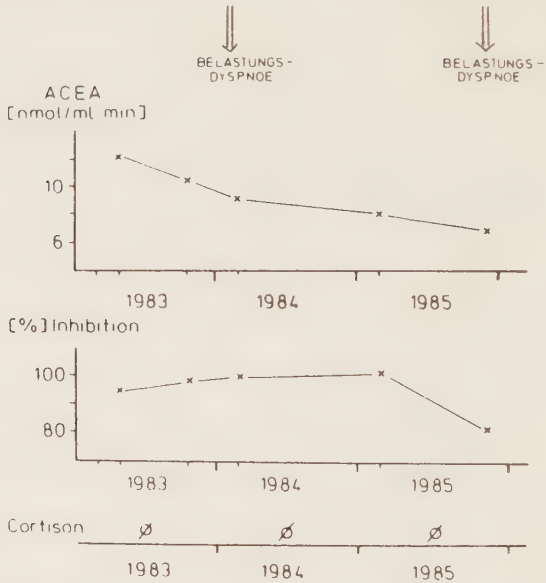


Abb. 43 Serum-ACE-Aktivität (oben) prozentuale ACE-Hemmbarkeit (mitte) und Corticoiddosis (unten) während des Behandlungszeitraumes.

A.G., 49 Jahre, ♀ Sarkoidose II-III

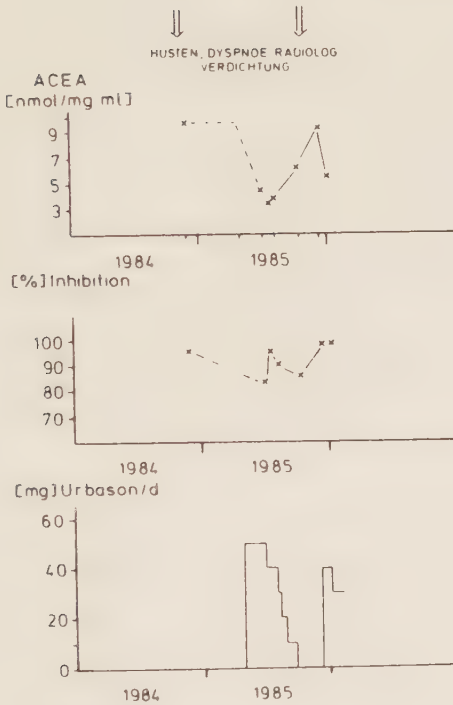


Abb. 44 Serum-ACE-Aktivität (oben), prozentuale ACE-Hemmbarkeit (mitte) und Corticoiddosis (unten) während des Behandlungszeitraumes.

FS, 29 Jahre ♂ Sarkoidose I

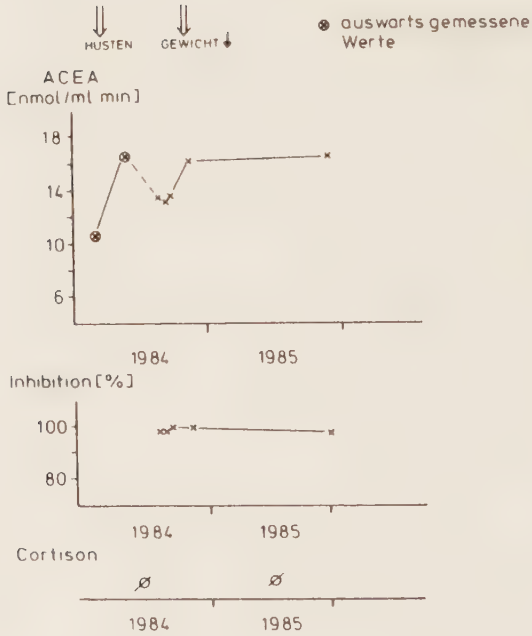


Abb. 45 Serum-ACE-Aktivität (oben), prozentuale ACE-Hemmbarkeit (mitte) und Corticoiddosis (unten) während des Behandlungszeitraumes.

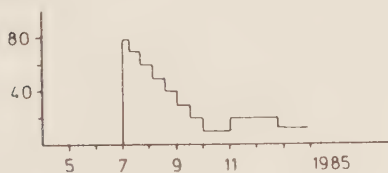
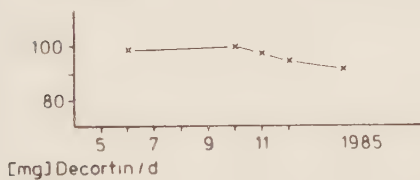


Abb. 46 Serum-ACE-Aktivität (oben), prozentuale ACE-Hemmbarkeit (mitte) und Corticoiddosis (unten) während des Behandlungszeitraumes.

4.4. Auftrennung der Serum-ACE-Aktivität mit Hilfe der Sephadex-Säulen-Chromatographie

Das ACE ist im Organismus recht verbreitet, jedoch in den einzelnen Organen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten enthalten. Die höchsten Werte wurden im Seminalplasma sowie in Hoden- und Nebenhoden (55, 123) und darauf folgend in Lunge und Niere gemessen. Die Frage nach der Herkunft des Blutplasmaenzyms läßt sich bisher nur unbefriedigend beantworten. Es wird vielfach angenommen, daß das Enzym in den Endothelzellen der Lunge synthetisiert und aus diesen ins Blutplasma abgegeben wird. Es wird auch postuliert, daß die hauptsächliche Convertierung der Angiotensine im Lungengefäßbett erfolgt. Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, daß bisher keine eindeutigen arteriovenösen Aktivitätsunterschiede des ACE für die Lunge ermittelt werden konnten. Es gibt Untersuchungen an Patienten, die intraoperativ mit der Herz-Lungenmaschine beatmet wurden, und über Patienten mit Lungenteilresektionen, aus denen ebenfalls nicht geschlossen werden konnte, daß das Plasma-ACE in erster Linie der Lunge entstammt (42).

Tierexperimentelle Befunde lassen vermuten, daß auch extrapulmonale Gefäßwände Syntheseort des Plasmaenzyms sein können. Unter einigen Bedingungen, z.B. bei zinkarmer Ernährung, konnte festgestellt werden, daß sich die Plasmaaktivität umgekehrt zu der der Gefäßwand verhält (106). In zinkverarmten Ratten sinkt die Aktivität im Plasma, während sie im arteriellen Gefäßwandgewebe ansteigt. Eine Abnahme der ACE-Aktivität in der arteriellen Gefäßwand wurde nach Gabe des Calcium-Antagonisten Nifedipin beobachtet, während sich die Serumaktivität nicht veränderte (31). Erdös und Mitarbeiter stellten fest, daß im Nierengewebe eine spezifisch höhere ACE-Aktivität enthalten ist als in der Lunge (39, 38, 37). Dieser Befund wurde auch von Schweisfurth erhoben (150). Der Autor ermittelte auch eine ansteigende spezifische

ACE-Aktivität mit kleiner werdendem Lungengefäßdurchmesser.

Die ursprüngliche Annahme, daß das Plasma-ACE hauptsächlich der Lunge entstammt und die Angiotensin-Convertierung vornehmlich dort stattfindet, beruht darauf, daß in der Lunge die höchste spezifische ACE-Aktivität der Kreislauforgane angenommen wird.

Maximale spezifische ACE-Aktivitäten sind im männlichen Genitaltrakt enthalten (123, 55, 127), und die Plasma-ACE-Aktivität von Männern ist, wie oben gezeigt, statistisch signifikant höher als bei Frauen. Bei Kindern sind bis zum 15. Lebensjahr keine Geschlechtsunterschiede nachweisbar (115).

Es stellt sich die Frage, ob das im Plasma enthaltene ACE verschiedener Herkunft ist und ob nicht ein Anteil der Niere und ein anderer dem männlichen Genitaltrakt entstammt. Durch Messung der ACE-Aktivität allein und auch durch die Bestimmung der Hemmbarkeit läßt sich diese Annahme nicht beweisen.

Die nachfolgenden Untersuchungen sollten auch klären, ob sich das im Plasma enthaltene ACE biochemisch einheitlich verhält, und ob durch eine differenzierte ACE-Messung verbesserte diagnostische Hinweise erzielt werden können.

Erdös konnte bereits mit einer isoelektrischen Fokussierung der Plasmaproteine eine Uneinheitlichkeit der ACE - Aktivität nachweisen (151). Dieser Autor nimmt jedoch an, daß das unterschiedliche Verhalten der ACE-Aktivität bei der isoelektrischen Fokussierung nicht durch die Proteinstruktur, sondern durch den Kohlehydratanteil (Sialinsäuren) verursacht wird. Es ist denkbar, daß einzelne der von Erdös et al beobachteten Banden bestimmten Geweben zugeordnet werden können. Darüber machten die Autoren jedoch keine Angaben.

Van Sande untersuchte die ACE-Aktivitäten mehrerer Organe mittels Gelelektrophorese und fand auch verschiedene ACE-Aktivitäts-Banden. Der Autor führt diese Heterogenität, wie Erdös et al (151), auf unterschiedliche Sialinsäuregehalte zurück (128).

4.4.1. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität (Aktivitätsspektren) gesunder Probanden

Übereinstimmend läßt sich in allen Diagrammen (Abb. 22 - 37) eine große Bande mit aufgesetzter Feinstruktur im Molekulargewichtsbereich 135 000 - 500 000 erkennen. Außerdem wurden zwei weitere Banden mit deutlich geringerer Aktivitätshöhe für kleinere Molekulargewichtsbereiche gefunden. Es ist bei dieser Methode nicht ausgeschlossen, daß durch Adsorptionseffekte fehlerhafte Molekulargewichte angezeigt werden. Jedoch kann festgestellt werden, daß die Banden reproduzierbar an denselben Stellen auftreten.

4.4.2. Molekulargewichtsbereiche der Serum-Enzyme gesunder Probanden

Wie aus den Tabellen 11 und 12 hervorgeht, lassen sich dem menschlichen Serum-ACE mehrere Molekulargewichtsbereiche zuordnen. Es kann daher angenommen werden, daß verschiedene Enzyme, die wahrscheinlich unterschiedlicher Herkunft sind, im Plasma vorkommen. Aufgrund der relativ großen Molekulargewichtsunterschiede erscheint es als recht unwahrscheinlich, daß die Enzyme sich nur durch ihre Kohlehydratanteile - wie von Erdös (151) angenommen - unterscheiden. Es ist jedoch möglich, daß Adsorptionseffekte die beobachteten Molekulargewichtsdifferenzen vortäuschen.

Lieberman konnte mit demselben Separationsverfahren nur eine doppelgipflige Bande im Molekulargewichtsbereich 250 000 erkennen. Er stellte ferner fest, daß dieser Aktivitätsgipfel immer an der gleichen Stelle auftritt, nämlich am aufsteigenden Schenkel des zweiten Proteinmaximums. Dieses enthält in der Hauptsache γ -Globuline und zum Teil β -Proteine (74).

Nishimura et al beobachteten mit Hilfe einer Sephadex-Gelfiltration (G-200) in Lungengewebeextrakten drei ACE-Aktivitätsbanden mit den Molekulargewichten 290 000, 180 000 und 98 000.

Eine weitere biochemische Charakterisierung zeigte, daß die Enzyme der ersten beiden Banden sich Enzyminhibitoren gegenüber gleichartig verhalten.

In Kalium-Phosphat-Puffer lag das pH-Optimum aller Peaks im Bereich um pH 8,3. Bei Verwendung eines Natrium-Borat-Puffers ließen sich dagegen mehrere pH-Optima im pH-Bereich 7,3 - 8,0 ermitteln.

Das in der dritten Bande enthaltene ACE war nicht durch Chloridionen beeinflussbar.

Im Gegensatz zum ACE der Bande III wurde das ACE der Banden I und II von Concanavalin-A-Sepharose adsorbtiv gebunden. Das unterschiedliche Adsorptionsverhalten wird von den Autoren durch verschiedene Kohlehydratanteile (Mannose) erklärt (89).

Kato trennte die Urinproteine an dem Sephadex-Gel G-200 auf und ermittelte die ACE-Aktivitäten im fraktionierten Eluat.

Er fand zwei Aktivitätsbanden, die den Molekulargewichtsbereichen 400 000 und 290 000 zugeordnet wurden. Durch Einwirkung von Trypsin ließ sich das Enzym mit dem Molekulargewicht von 400 000 in eines mit geringerem Molekulargewicht (290 000) umwandeln. Beide Enzyme waren mit dem Nieren-ACE identisch (65).

Auch Kokubu trennte die Proteine aus Urin und Plasma gelchromatographisch auf. Er bestimmte in beiden Fällen je drei Enzymaktivitätsbanden und für diese die Molekulargewichte 400 000, 290 000 und 140 000 (68).

Fitz konnte dagegen in Lungengewebsextrakten nur eine ACE-Aktivitätsbande mit dem Molekulargewicht 480 000 mittels Gelchromatographie nachweisen (45).

Zusammenfassend wird festgestellt, daß alle Maxima der Bande I in der Literatur Erwähnung finden. Dieses erfolgt jedoch nicht in der Gesamtheit von einem Autor. Die Aktivitätsbanden II und III wurden bisher von anderer Seite nicht beobachtet.

4.4.3. Geschlechtsunterschiede der Elutionsprofile bzw. Molekulargewichtsbereiche

Es fällt deutlich auf, daß bei Männern die Unterteilung der ersten Hauptbande stärker ausgebildet ist als bei Frauen. Das erste Maximum ($MG\ 480\ 000 \pm 34\ 000\ SD$) der Bande I wurde bei vier Männern und nur bei einer Frau beobachtet. Bei diesem Gipfel ist der Geschlechtsunterschied am stärksten ausgeprägt. Möglicherweise repräsentiert dieser Peak ein Enzym gonadaler Herkunft.

Die Bande I mit dem Molekulargewicht $350\ 000 \pm 2\ 500\ (SD)$ konnte insgesamt achtmal beobachtet werden, davon sechsmal bei Männern und nur zweimal bei Frauen. Der letzte Peak der ersten Hauptbande war bei Männern viermal und Frauen dreimal annähernd gleich häufig vertreten.

Betrachtet man das Auftreten der Banden in Abhängigkeit vom Alter der Probanden, so ist keine Altersabhängigkeit zu erkennen.

4.4.4. Aktivitätsmittelwerte der Einzelbanden

Aus Tabelle 13 ist zu entnehmen, daß die Banden der Molekulargewichtsbereiche 250 000 - 300 000 und 200 000 - 250 000 stärker bei den Frauen als bei den Männern ausgebildet sind. Die mittlere Enzymaktivität der Bande im Bereich 400 000 - 550 000, die mit einer Ausnahme nur bei Männern gefunden wurde, beträgt $11,29 \text{ nmol/ml} \cdot \text{min} \pm 1,89 \text{ (SD)}$.

Es ist möglich, daß den Enzymen einzelner Banden andere pH-Optima zukommen. Unter optimalen Reaktionsbedingungen gemessen, würden diese Peaks dann stärker hervortreten.

Das von Boucher et al erstmals beschriebene β -Converting-Enzyme, auch Tonin genannt, hat ein pH-Optimum im Neutralbereich (17), und das von Schweisfurth et al nachgewiesene renale Iso-Converting-Enzyme besitzt ein pH-Optimum bei pH 6,5 (29).

Es ist Aufgabe zukünftiger Untersuchungen, die biochemischen Eigenschaften und optimalen Reaktionsbedingungen der einzelnen Isoenzyme herauszufinden.

4.5. Elutionsprofile der Serum-ACE-Aktivität (Aktivitätsspektren) anephrischer Patienten

Nach wie vor ist ungeklärt, woher das im Plasma enthaltene ACE stammt. Es konnte bisher nicht überzeugend nachgewiesen werden, daß das Plasmaenzym in der Lunge synthetisiert und von diesem Organ ins Blut abgegeben wird. Sicherlich sind im Lungengewebe sehr hohe spezifische ACE-Aktivitäten enthalten, jedoch steht heute fest, daß im männlichen Genitaltrakt (55, 123) und auch in der Niere (37, 39, 150) höhere Aktivitäten vorkommen.

Da sich die Serum-Enzymaktivitäten der männlichen Patienten oder Probanden zwar statistisch signifikant, aber nur um ca. 10 % von denen der weiblichen unterscheiden (74), kann das ACE des männlichen Genitaltraktes nur einen kleinen Anteil der gesamten Plasma-Aktivität ausmachen.

Im vorangehenden Abschnitt ist bereits darauf hingewiesen worden, welche Aktivitätsbanden diesem Enzym zugeordnet werden könnten. Es ist berechtigt anzunehmen, daß ein Anteil des Plasmaenzyms der Niere entstammt; denn in diesem Organ ist die spezifische Enzymaktivität mindestens so groß wie in der Lunge (37, 39, 150). Daß diese Beobachtung erst in den letzten Jahren gemacht wurde, liegt daran, daß der Gewebeaufschluß des Nierenparenchyms aufwendiger ist als der der Lunge. Da in der Niere die höchsten spezifischen Reninaktivitäten enthalten sind und ein eigenständiges intrarenales Renin-Angiotensin-System postuliert wird, kommt dem renalen ACE eine besondere Bedeutung zu.

Für alle bilateral nephrektomierten Patienten (drei Frauen, ein Mann), konnte eine Bande im Molekulargewichtsbereich 400 000 - 575 000 ermittelt werden. Dieser Peak wurde bei Gesunden hauptsächlich bei Männern und nur einmal bei

Frauen, beobachtet. Auffallend ist jedoch, daß die mittlere ACE-Aktivität dieser Bande bei den anephrischen Patienten statistisch signifikant niedriger ist als bei den gesunden Kontrollen, so daß angenommen werden kann, daß renales ACE mit diesem Molekulargewicht im Plasma enthalten ist.

J. Pschorr ermittelte für Nebenhoden- und Nierenrinden-ACE nahezu übereinstimmende Michaelis-Konstanten (105).

Eine Bande im Molekulargewichtsbereich 300 000 - 400 000 wurde nur einmal beobachtet. In diesem Fall betrug die ACE-Aktivität nur etwa 30 % der gesunden Probanden. In den Molekulargewichtsbereichen 150 000 - 250 000, in denen drei Aktivitätsbanden bei den Kontrollen nachgewiesen werden konnten, ließen sich bei den anephrischen Patienten keine Aktivitätsmaxima feststellen.

Alle anephrischen Patienten zeigten eine Bande im Molekulargewichtsbereich 40 000 - 80 000, die bei den Gesunden nur viermal vertreten war. Dieses Maximum war jedoch beim Vergleich mit den gesunden Kontrollen etwas nach höheren Molekulargewichten verschoben. Die mittlere Enzymaktivität war deutlich gegenüber den gesunden Probanden erhöht.

In diesem Zusammenhang erscheinen die von Miura et al (82) veröffentlichten Befunde interessant, die besagen, daß die Plasma-ACE-Aktivitäten bei dialysepflichtigen Patienten mit chronischem Nierenversagen signifikant höher sind als bei gesunden Kontrollen. Die Autoren geben außerdem an, daß die Enzymwerte mit der Dauer der Dialysebehandlung ansteigen. Es ist möglich, daß bei diesen nicht nephrektomierten Kranken die Erhöhung der Serum-Aktivitätswerte durch ein Enzym renal-er Herkunft bedingt wird.

Es ist denkbar, daß bei den anephrischen Patienten der Fortfall der renalen ACE-Aktivität von einem anderen Organ

(teilweise) kompensiert wird.

Es wird berichtet, daß bei Suppressionen der Plasma-ACE-Aktivität die Enzymkonzentration, d.h. die Zahl der Moleküle pro Volumeneinheit im Plasma ansteigt (106) und daß gleichzeitig die ACE-Synthese in der arteriellen Gefäßwand stimuliert wird.

Die dritte Hauptbande, die wahrscheinlich durch Adsorptionseffekte am Sephadexgel verursacht oder beeinflusst wird, tritt bei den anephrischen Patienten in gleicher Weise wie bei den gesunden Probanden auf.

Die Untersuchungen der bilateral nephrektomierten Patienten zeigen eine charakteristische Veränderung des Aktivitätsspektrums des Plasma-ACE. Sie lassen erkennen, daß renales Converting-Enzyme im Plasma enthalten ist und daß möglicherweise ein Feed-back-Mechanismus die ACE-Synthese anderer Gewebe stimuliert.

Bei den vorliegenden Ergebnissen muß ferner berücksichtigt werden, daß anephrische Patienten in unregelmäßigen Abständen Fremdblut infundiert bekommen, so daß die eigenen ACE-Aktivitäten evtl. noch niedriger sein könnten.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Zuordnung der Einzelbanden des Aktivitätsspektrums aufzuklären und um auf diese Weise einen Anhalt über die Lokalisation der Sarkoidose und anderer Erkrankungen zu erhalten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen hatten zum Ziel, eine für die Routine geeignete Methode zur Aktivitätsbestimmung des Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) im menschlichen Serum herauszufinden, ihre Meßgenauigkeit zu ermitteln und zu klären, ob die Enzymaktivität von Geschlecht, Alter und jahreszeitlichen Einflüssen abhängig ist.

Außerdem sollten die Meßwerte eines Patientenkollektivs analysiert und diskutiert werden.

Insbesondere war zu untersuchen, ob eine differenzierte Aktivitätsbestimmung nach chromatographischer Auftrennung der Isoenzyme möglich ist und ob auf diese Weise das Aussagevermögen erweitert werden kann, so daß eine Lokalisation befallener Organe ermöglicht wird.

Drei Methoden wurden zur Aktivitätsbestimmung des Serum-ACE eingesetzt, die spektralphotometrische nach Lieberman, die fluorimetrische nach Piquilloud et al und das radiochemische Verfahren der Firma Ventrex Laboratories, Portland, U.S.A.

Die Auftrennung der Serumproteine erfolgte durch Sephadex-Gelfiltration an dem Gel G-200. Im fraktionierten Eluat wurden Enzymaktivität und Extinktion - als Maß der Proteinkonzentration - und jeweils das Volumen gemessen.

Die Seren stammten von etwa 350 Patienten der Pneumologischen Abteilung im Klinikum Großhadern, vorwiegend mit Verdacht auf Sarkoidose und von vier bilateral Nephrektomierten des Zentrums Innere Medizin der Universität Ulm.

Ein Vergleich der drei Aktivitätsbestimmungsmethoden zeigte, daß für die Messung des menschlichen Serum-ACE die von Cushman und Cheung entwickelte und von Lieberman modifizierte am besten geeignet ist. Die kleinsten ACE-Aktivitäten können jedoch mit der fluorimetrischen Technik erfaßt werden.

Für die Lieberman-Methode wurden die Intra- ($1,8 \pm 0,34$ SD; $n = 178$) und Interassayvariationskoeffizienten ($6,30 \pm 0,85$ SD; $n = 178$) berechnet, und es konnte für die Meßwerte eine Normalverteilung nach Gauß nachgewiesen werden. Fehlerquellen ließen sich für niedrige Enzymaktivitäten, gefärbte und trübe Seren ausmachen, und es konnten Maßnahmen aufgezeigt werden, diese zu erkennen bzw. zu vermeiden. Die zusätzliche Messung der Hemmbarkeit mit einem spezifischen ACE-Inhibitor und die Verwendung von gefroren aufbewahrten Mischseren als Eichstandards führten zu einer Verbesserung der Meßgenauigkeit. Das Stabilitätsverhalten des Serum-ACE wurde während einer mehrmonatigen Aufbewahrung im gefrorenen Zustand untersucht, und es konnten nur geringe Aktivitätsveränderungen ($0,35 \text{ \%/Monat} \pm 0,27$ SD) beobachtet werden.

Es wurden Mittelwerte für das gesamte Patientengut ($7,47 \pm 3,47$ SD; $n = 326$) sowie getrennt nach Geschlecht und Alter bestimmt und mit der Enzymaktivität gesunder Probanden ($7,64 \pm 1,38$; $n = 32$) und Literaturwerten verglichen. Die ACE-Aktivität männlicher Patienten war statistisch signifikant höher ($p < 0,025$) als die der weiblichen.

Für fünf Patienten mit histologisch gesicherter Sarkoidose konnte festgestellt werden, daß während der Therapie die Enzymaktivitäten den Aktivitätszustand der Erkrankung reflektieren.

Die Ermittlung der prozentualen Hemmbarkeit des ACE mit einem spezifischen ACE-Inhibitor in Abhängigkeit von der Höhe der Serumaktivität läßt auf die Existenz von Isoenzymen schließen. Die Annahme wird bestärkt durch die Aktivitätsmessungen nach vorangegangener säulenchromatographischer Auftrennung der Serumproteine.

Reproduzierbare Aktivitätsprofile mit drei Hauptbanden und aufgesetzter Feinstruktur konnten für 16 gesunde Probanden ermittelt und zugehörige Molekulargewichtsbereiche bestimmt

werden. Eine Geschlechtsabhängigkeit ist erkennbar. Die Aktivitätsprofile der bilateral nephrektomierten Patienten unterschieden sich signifikant von den Kontrollen. Das deutet darauf hin, daß die Serum-ACE-Aktivität teilweise der Niere entstammt und außerdem renal beeinflufßbar ist. Die Messung derartiger Aktivitätsprofile eröffnet zusätzlich die Möglichkeit einer Lokalisation erkrankter Organe.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. G.K. Ackers:
A new calibration procedure for gel filtration columns.
J. Biol. Chem. 242: 3237-3238, 1967
2. H.A. Anderson, R.S. Fontana, E.G. Harrison:
Transbronchoscopic lung biopsy in diffuse pulmonary disease.
Chest 48: 187, 1965
3. R.C. Anderson, P.N. Herbert, P.J. Mulrow:
A comparison of properties of renin obtained from the
kidney and uterus of the rabbit.
Am. J. Physiol. 215: 774-778, 1968
4. H.A. Azar, E.A. Moscovici, S.G. Abu Nassar, J.St. McDougal:
Some aspects of sarcoidosis.
Curr. Top. Pathol. 57: 49, 1973
5. Y.S. Bakhle:
Conversion of angiotensin I to angiotensin II by
cell-free extracts of dog lung.
Nature (London) 220: 919, 1968
6. Y.S. Bakhle, A.M. Reynard, J.R. Vane:
Metabolism of the angiotensins in isolated perfused tissues.
Nature (London) 222: 956-959, 1969
7. L. Barajas:
Anatomy of the juxtaglomerular apparatus.
Am. J. Physiol. 237: 333-343, 1979
8. X. Baur, G. Fruhmann, H. Dahlheim:
Verhalten der Angiotensin-I-Converting-Enzym-Aktivität
bei Sarkoidose.
Atemwegs- und Lungenkrankheiten.
5: 236-238, 1979
9. X. Baur, G. Fruhmann, H. Dahlheim:
Zur Wertigkeit des Angiotensin-I-Converting-Enzym-
Serumspiegels für die Diagnose und den Krankheitsverlauf
der Sarkoidose.
Verh.Dtsch.Ges.Innere Med.
85: 1148-1151, 1979
10. X. Baur, G. Fruhmann, G. König, H. Dahlheim:
Änderung des Angiotensin-Converting-Enzyms als Kriterium
für den Verlauf einer Sarkoidose.
Verh.Dtsch.Ges.Innere Med.
86: 1145-1149, 1980

11. J. Bing, K. Poulsen, J. Markussen:
The ability of various insulins and insulin fragments
to inhibit the angiotensin I converting enzyme.
Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect. A) 6: 777-782, 1982
12. H.E. Bock, W. Kaufmann, G.-W. Löhr:
Pathophysiologie - Ein kurzgefaßtes Lehrbuch
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1983
13. C. Boeck:
Multiple benign sarcoids of the skin
Am. J. Cutan. Genito. Urin. Dis. 17: 543-550, 1899
14. D. Böttger:
Über die Bedeutung der Tuberkulinempfindlichkeit bei
der Lungsarkoidose.
Z. Erkr. Atmungsorgane 151: 189, 1970
15. D. Böttger:
Prognostic significance of lymphopenia in pulmonary
sarcoidosis.
Z. Erkr. Atmungsorgane 149: 197, 1977
16. R. Boucher, M. Saidi, J. Genest:
A new "angiotensin I converting enzyme" system.
In: *Hypertension* 72, ed. by J. Genest and E. Koiv,
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 512-523, 1972
17. R. Boucher, J. Asselin, J. Genest:
A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II
Circ. Res. 34, Suppl. I: 203-209, 1974
18. E. Braun-Menéndez, J.C. Fasciolo, L.F. Leloir, J.M. Munoz:
The substance causing renal hypertension.
J. Physiol. 98: 283-298, 1940
19. R.D. Bunang, I.H. Page, J.W. McCubbin:
Inhibition of renin release by vasopressin and angiotensin.
Cardiovascular Res. 1: 67-73, 1967
20. H. Cain, B. Kraus:
Asteroid bodies: Derivations of the cytosphere.
Virchows Arch. 26: 119-121, 1977
21. 18. O. Carretero, B. Berjak, J.A. Houle:
Renin isoenzymes of extrarenal origin.
Am. J. Physiol. 220: 1468-1472, 1971
22. U.H. Cegla, J. Meier-Sydow:
Diagnostik und Therapie der Sarkoidose.
Medizin 18: 37, 1973

23. H.S. Cheung, D.W. Cushman:
Inhibition of homogeneous angiotensin converting enzyme
of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops*
jararaca.
Biochim. Biophys. Acta 293: 451-463, 1973
24. S. Cohen, J.M. Taylor, M. Murakami:
Isolation and characterization of renin-like enzymes
from mouse submaxillary gland.
Biochemistry 11: 4286-4293, 1972
25. R.G. Crystal, W.C. Roberts, G.W. Hunninghake, I.E. Gadek,
J.D. Fulmer, B.R. Line:
Pulmonary sarcoidosis: a disease characterized and
perpetuated by activated T-lymphocytes.
Ann. Intern. Med. 99: 73, 1981
26. D.W. Cushman, H.S. Cheung:
Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues
of the rat.
Biochim. Biophys. Acta 250: 261-265, 1971
27. D.W. Cushman, H.S. Cheung:
Spectrophotometric assay and properties of the
angiotensin-converting enzyme of rabbit lung.
Biochemical Pharmacol. 20: 1637-148, 1971
28. D.W. Cushman, H.S. Cheung:
Studies in vitro of angiotensin-converting enzyme of lung
and other tissues.
Hypertension, 1972 (J. Genest, E. Koiw, eds),
Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York: 532, 1972
29. H. Dahlheim, H. Schweisfurth:
Does the kidney contain its own angiotensin I-converting
enzyme?
Pflügers Arch. ges. Physiol. 359 (Suppl.): 125, 1975
30. H. Dahlheim, I.C.M. Jacob, J. Pschorr, J. Rosenthal
The renin angiotensin system in the extrarenal vascular
walls: An approach to studies in humans.
Hormons in Normal and Abnormal Human Tissues III: 251-284,
1983
31. H. Dahlheim, J. Pschorr, N.v. Lutterotti, M. Thurnreiter,
I. Jacob, S. Kazda, B. Garthoff, J. Rosenthal
Does the renin angiotensin system in vascular walls
participate in pathogenesis of spontaneously hypertensive rats?
International Meeting on Diuretics, Sorrento, Mai 1986

32. H. Dahlheim:
Persönliche Mitteilung
33. R.A. De Remee:
The present status of treatment of pulmonary sarcoidosis:
A house divided.
Chest 71: 388-392, 1977
34. R.A. De Remee, M.S. Rohrbach:
Normal serum angiotensin converting enzyme activity
in patients with newly diagnosed sarcoidosis.
Chest 85: 45-48, 1984
35. E. Doll, H. Kröpelin:
Atemmechanische Untersuchungen bei Lungensarkoidose.
Pneumonol. 148: 7, 1972
36. A.E. Doyle, A.G. Bearn:
Hypertension and the angiotensin system: Therapeutic
approaches.
Merck Sharp and Dohme International Medical Advisory
Council Strasbourg, 1983
37. E.G. Erdös, G. Oshima:
The angiotensin I-converting enzyme of the lung and
kidney
Acta Physiol. Latino. Amer. 24: 507-511, 1974
38. E.G. Erdös, R.A. Skidgel:
Structure and functions of human angiotensin I-converting
enzyme (kininase II).
Biochem. Soc. 42: 11-13, 1985
39. E.G. Erdös, R.A. Skidgel, L.T. Tam:
Human renal angiotensin I-converting enzyme and its
"Helper Enzyme".
Intern. Symposium: "Angiotensin, ACE-Inhibition and
the Kidney".
Venedig, Italien, 1985
40. E.G. Ewert:
Epidemiologie der Sarkoidose.
Der Internist
23: 298-303, 1982
41. B.L. Fanburg, M.D.B. Schoenberger, G.L. Snider:
Elevated serum converting enzyme in sarcoidosis.
Am. Res. Dis. 114: 525-528, 1976
42. L. Favre, M.B. Vallotton, A.F. Muller:
Relationship between plasma concentrations of angiotensin I,
angiotensin II and plasma renin activity during cardio-
pulmonary bypass in man.
Europ. J. Invest. 4: 135-140, 1974

43. R. Ferlinz:
Lungen- und Bronchialerkrankungen.
Thieme Verlag, Stuttgart, 1974
44. S.H. Ferreira, D.C. Bartelt, L.J. Greene:
Isolation of bradykinin-potentiating peptides from
Bothrops jararaca venom.
Biochem. 9: 2583-2592, 1970
45. A. Fitz, M. Overturf:
Molecular weight of human angiotensin I lung
converting enzyme.
J. Biol. Chem. 247: 581-584, 1972
46. R. van Furth:
The mononuclear phagocyte system.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 64: 1, 1980
47. F.X. Galen, C. Devaux, T. Guyenne, J. Menard, P. Corval:
Multiple forms of human renin, purification and
characterization.
J. Biol. Chem. 254 (11): 4848-4855, 1979
48. H. Goldblatt:
The renal origin of hypertension
Charles Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA, 1948
49. A.B. Gould, L.T. Skeggs, J.R. Kahn:
The presence of renin activity in blood vessel walls.
J. exp. Med. 119: 389-399, 1964
50. C. Grönhagen-Riska, O. Selroos, M. Niemistö:
Angiotensin converting enzyme.
V. Serum levels as monitors of disease activity in
corticosteroid-treated sarcoidosis.
Eur. J. resp. Dis. 60: 113, 1980
51. R. Gross, D. Jahn, P. Schölmerich:
Lehrbuch der Inneren Medizin.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1970
52. E. Hackenthal, R. Taugner:
Immunological localization of components of the renin
angiotensin system in the kidney.
"Angiotensin, ACE Inhibition and the Kidney",
Intern. Symposium, Abstract, Venedig, Italien, 1985
53. G.J. Hagemann, K. Wurm:
Bei Sarkoidose auf Herzbefall achten.
Med. Klin. 75: 665, 1980

54. O.H. Helmer:
Differentiation between two forms of angiotonin by
means of spirally cut strips of rabbit aorta.
Am. J. Physiol. 188: 571-577, 1957
55. G. Hohlbrugger, H. Schweisfurth, H. Dahlheim:
Angiotensin I-converting enzyme in rat testis, epididymis
and vas deferens under different conditions.
J. Reprod. Fert. 65: 97-103, 1982
56. J.P. Hummel, W.J. Dreyer:
Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration.
Biochim. Biophys. Acta 63: 530-532, 1962
57. G.W. Hunninghake, J.D. Fulmer, R.C. Young jr., J.E. Gadek
and R.G. Orystal:
Zur Lokalisation der Immunantwort bei Sarkoidose.
Am. Rev. Resp. Dis. 120: 49, 1979
58. T. Inagami, N. Takatrashi, N. Yokosawa, Y. Tokii:
Partial purification of prorenin and activation by kallikrein:
a possible new link between renin and kallikrein system
Advances in Exp. Med. and Biol. 120 B: 415-428, 1979
59. H. Israel:
Sarcoidosis
In Simmons (ed.), *Current pulmonology*,
Houghton, Mifflin Professional Publishers, Boston, 1979
60. K.J. Isselbacher, R.D. Adams, E. Braunwald, R.G. Petersdorf,
J.D. Wilson:
Principles of Internal Medicine.
McGraw Hill Intern. Book Comp., 1980
61. D.G. James, E. Neville, L.E. Siltzbach et al:
A worldwide review of sarcoidosis.
In: L.E. Siltzbach (ed.), *Proc. VIIth Intern. Conf. on Sarcoidosis*
Ann. NY Acad. Sci. 278: 321, 1976
62. H.H. Jansen, Fr.W. Kalkmann, E. Kraus
Der extrapulmonale Morbus Boeck unter besonderer
Berücksichtigung seiner zerebralen und okulären
Manifestation.
Aerztl. Forsch. 23: 249, 1969
63. N. Johnson, M.W. McNicol, J. . Burton-Kee, J.F. Mowbray:
Zirkulierende Immunkomplexe Bei Sarkoidose.
Thorax (London) 35: 286, 1969
64. W. Jones-Williams:
The nature and origin of Schaumann bodies.
J. Pathol. Bact. 79: 193 - 195, 1960

65. I. Kato, Y. Takada, K. Nishimura, K. Hiwada, T. Kokubu:
Increased urinary excretion of angiotensin converting
enzyme in patients with renal diseases.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 20: 473-476, 1982
66. M. Kavai, S. Vezendi, L. Mañdi, I. Sonkoly, G. Szegedi:
Zirkulierende Immunkomplexe und periphere T-Zellen bei
Sarkoidose.
Pneumonol. Hung. 32: 31-33, 1979
67. J. Kohout:
Typische und atypische pulmonale Verlaufsformen der
Sarkoidose.
Prax. Klin. Pneumonol. 31: 944, 1977
68. T. Kokubu, I. Kato, K. Nishimura, K. Hiwada, E. Ueda:
Angiotensin I-converting enzyme in human urine.
Clin. Chim. Acta, 89: 375-379, 1978
69. D.K. Krause, W. Hummerich, K. Poulsen:
Radioimmunoassay-Renin-Angiotensin
Principles of Radioimmunoassay and their Application in
Measuring Renin and Angiotensin.
Thieme Verlag, Stuttgart, 1978
70. V.A.W. Kreye, F. Gross:
Conversion of angiotensin I to angiotensin II
in peripheral vascular beds of the rat.
Am. J. Physiol., 220: 1294, 1971
71. T.C. Laurent, J. Killander:
A theory of gel filtration and its experimental verification.
J. Chromatogr. 14: 317-330, 1964
72. K.E. Lentz, L.T. Skeggs, K.R. Woods, J.R. Kahn, N.P. Shumway:
Amino acid composition of hypertensin II and its
biochemical relationship to hypertensin I.
J. Exp. Med. 104: 183-191, 1956
73. R. Lesch, H.K. Koch:
Die Sarkoidose aus der Sicht des Pathologen.
Der Internist. 23: 304-313, 1982
74. J. Lieberman:
Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE)
level in sarcoidosis.
Am. J. Med. 59: 365-372, 1975
75. H. Lutz, K. Rother:
Plasmatherapie - Indikation zur Behandlung mit
Plasmaproteinen.
Med. Verlagsgesellschaft: 208-209, 1985

76. A. Mändl, L. Mändl, J. Endres et al:
Knochenveränderungen bei Sarkoidose.
Beitr. Orthop. 27: 586, 1980
77. B. Mariani:
Sarcoidosis therapy with cortisone and ACTH -
The role of ACTH.
Z. Erkr. Atmungsorgane 149: 153-155, 1982
78. E. Meier, M. Cvitanović:
Bericht über den 9. Durchgang der Röntgenreihenuntersuchung
im Bundesland Schleswig-Holstein.
Prax. Pneumol. 35: 170, 1981
79. F.A.O. Mendelsohn:
Direkt evidence for local formation of angiotensin II
(A II) in kidney.
Abstracts of free communications.
Vith Intern. Congr. Nephrol., Florenz, 1975
80. F.A.O. Mendelsohn:
Angiotensin II receptors in rat kidney.
"Angiotensin, ACE Inhibition and the Kidney",
Intern. Symposium, Abstract
Venedig, Italien, 1985
81. D.M. Mitchell, J.G. Scadding:
Sarcoidosis
Am. Rev. Resp. Dis. 110: 1461, 1976
82. H. Miura, M. Nakayama, T. Sato:
Serum angiotensin converting enzyme (S-ACE) activity
in patients with chronic renal failure on regular
hemodialysis.
Jap. Heart J. 25: 87-92, 1984
83. B.J. Morris, R.L. Nixon, C.I. Johnston:
Release of renin from glomeruli isolates from rat kidney.
Clin. Exptl. Pharmacol. Physiol. 3: 37-47, 1976
84. J.K. Müller-Hermelink, E. Kaiserling:
Epitheloidzellreaktionen im lymphatischen Gewebe.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 64: 77-81, 1980
85. A. Nasjletti, G.M.C. Masson:
Studies on angiotensinogen formation in a liver
perfusion system.
Circ. Res. 30-31, Suppl. II: 187-202, 1972
86. O.-A. Neumüller:
Römpps Chemie Lexikon
Francksche Verlagshandlung, Stuttgart, 1972

87. K.K.F. Ng, J.R. Vane:
Conversion of angiotensin I to angiotensin II.
Nature (London). 216: 762-766, 1967
88. K.K.F. Ng, J.R. Vane:
Fate of angiotensin I in the circulation.
Nature (London). 218: 144-150, 1968
89. K. Nishimura, N. Yoshida, K. Hiwada, E. Ueda, T. Kokubu:
Properties of three different forms of angiotensin I
converting enzyme from human lung.
Biochim. et Biophys. Acta, 522: 229-237, 1978
90. C. Ody, A.F. Junod:
Converting enzyme activity in endothelial cells
isolated from pig pulmonary artery and aorta.
Am. J. Physiol. 232: C 95, 1977
91. T. Okabe, K. Yamagata, M. Fujisawa, J. Watanabe, F. Takaku:
Increased angiotensin converting enzyme in peripheral blood
monocytes from patients with sarcoidosis.
J. Clin. Invest. 75: 911-914, 1985
92. M.A. Ondetti, D.W. Cushman:
Enzymes of the renin-angiotensin-system and their inhibitors.
Ann. Rev. Biochem. 51: 283-308, 1981
93. K. Otokida, M. Nakamura, K. Kawamura, S. Kanazawa, M. Kato:
Chromatographic elution profiles of angiotensin converting
enzyme measured by the methods using different substrates
in the plasma from normotensive and hypertensive subjects.
Tohoku J. Exp. Med., 144: 91-101, 1984
94. I.H. Page, O.M. Helmer:
A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting
from the reaction between renin and renin-activator.
J. Exp. Med. 71: 29-42, 1940
95. I.H. Page, F.M. Bumpus:
Angiotensin
Physiol. Rev. 41: 331, 1961
96. Pharmacia Fine Chemicals:
Sephadex Chromatographierohre - Standardgeräte für die
Laboratoriumspraxis.
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, Oktober 1967-1
97. Pharmacia Fine Chemicals:
Gel Filtration Calibration Kit
Instruction Manual for Protein Molecular Weight Determinations
by Gel Filtration
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, 1985

98. Pharmacia Fine Chemicals:
Gel Filtration, theory and practice.
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
99. K. Pietilö, T. Koivula:
Increase of serum angiotensin-converting enzyme activity
after freezing.
Scand. J. Lab. Invest., 44: 453-455, 1984
100. Y. Piquilloud, A. Reinharz, M. Roth:
Studies on the angiotensin converting enzyme with
different substrates.
Biochim. Biophys. Acta. 206: 136-142, 1970
101. D. Pongratz, D. Burg:
Sarkoidose: Neurologische Organ-Manifestation
- ein kasuistischer Beitrag.
Münch. Med. Wochenschr. 121: 853, 1979
102. J. Porath:
Some recently developed fractionation procedures and their
application to peptide and protein hormones.
J. Am. Chem. 6: 233-244, 1963
103. M.M. Poth, G.G. Heath, M. Ward:
Angiotensin converting enzyme in human brain.
J. Neurochem. 25: 83-85, 1975
104. E. Prugberger:
Zur Sarkoidose des Herzens
Pneumonol. Prax. Klin. 33: 1084, 1979
105. J. Pschorr:
Das Verhalten des Angiotensin I-Converting Enzyme im Plasma
und in Geweben der Ratte unter Kontrollbedingungen und nach
Stimulation des RAS.
Diplomarbeit, Biol. Fakultät der Universität Tübingen, 1982
106. J. Pschorr, C.L. White, N.v. Lutterotti, J.C.M. Jacob,
H. Dahlheim, J. Rosenthal:
Indication for feed-back control of angiotensin I
converting enzyme (ACE).
Pflügers Arch. 406: Suppl., R 45, 1986
107. K.L. Radenbach, W. Matthiesen:
Sarkoidose
Dtsch. Aerztebl. 71: 995, 1974
108. B. Ramm, G. Hoffmann:
Biomathematik und medizinische Statistik
Enke Verlag, Stuttgart, 1976

109. I.A. Reid, W.H. Tu, K. Otsuka et al:
Studies concerning the regulation and importance of
plasma angiotensinogen concentration in dog.
Endocrinol. 93: 107-114, 1973
110. G. Reusch:
Klinik der Sarkoidose
Der Internist. 23: 314-324, 1982
111. P. Richter:
Verhalten der Renin- und Angiotensin I-Converting
Enzyme Aktivitäten im Serum und Nierengewebe der Ratte
unter Kontrollbedingungen und nach Katecholaminapplikation.
Dissertation, München, 1985
112. W. Rick:
Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977
113. G. Riecker et al:
Therapie innerer Krankheiten
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983
114. W.A. Rightsel, T. Okamura, T. Inagami, J.A. Pitcock,
Y. Takii, B. Brooks, P. Brown, E.E. Muirhead:
Juxtaglomerular cells grown as monolayer cell culture
contain renin, angiotensin I-converting enzyme, and
angiotensins I and II/III.
Circulat. Res. 50: 822-829, 1982
115. G.E. Rodriguez, B.C. Shin, R.S. Abernathy, E.L. Kendig:
Serum angiotensin converting enzyme activity in normal
children and in those with sarcoidosis.
J. of Pediatrics, 99: 68-72, 1981
116. M.S. Rohrbach:
Metabolism and subcellular localization of angiotensin
converting enzyme in cultured human monocytes.
Biochem. and Biophys. Res. Communications.
124: 843-849, 1984
117. F.K. Rømer, F. Jacobsen:
The influence of prednisone on serum angiotensin-converting
enzyme activity in patients with and without sarcoidosis.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 42: 377-382, 1982
118. Y. Rosen, J.C. Vuletin, L.B. Pertschuk, E. Silverstein:
Sarcoidosis from the pathologist's vantage point.
Pathol. Ann. 14/2: 405, 1982
119. J. Rosenthal, R. Boucher, J.M. Rojo-Ortega, J. Genest:
Renin activity in aortic tissue of rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 47: 53-56, 1969

120. J. Rosenthal, J. Pschorr, I.C.M. Jacob, M.L. Michailov, B. Pfeifle, H. Dahlheim:
Further evidence for the existence of an intrinsic renin angiotensin system in extrarenal vascular tissue.
Dtsch. Ges. f. Endocrinol. 27, Symposium, 1983
121. M. Rosenthal, K. Wurm, W. Müller:
Zirkulierende Immunkomplexe bei der Sarkoidose.
Prax. Pneumol. 31: 75, 1977
122. M.D. Rossmann, J.H. Dauber, R.P. Danile:
Identifizierung von aktivierten T-Zellen bei Sarkoidose.
Am. Rev. Resp. Dis. 117: 713, 1978
123. D. Roth, M. Roth:
Purification of angiotensin-converting enzyme from human seminal plasma.
Experientia. 30: 686, 1974
124. M. Roth, A.F. Weitzmann, Y. Piquilloud:
Converting enzyme content of different tissues of the rat.
Experientia. 25: 1247, 1969
125. J.W. Ryan, A. Chung, U.S. Ryan:
Angiotensin-converting enzyme. I. New strategies for assay.
Environmental Health Perspectives. 35: 165-170, 1980
126. L. Sachs:
Statistische Methoden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979
127. M.E. van Sande, S.L. Sharpè, H.M. Neels, K.O. van Camp:
Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues.
Clin. Chim. Acta. 147: 255-260, 1985
128. M.E. van Sande, S.L. Sharpè, H.M. Neels:
Multiple forms of angiotensin-converting enzyme in human tissues and fluids.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 23: 381-386, 1985
129. W. Sandritter, R. Arold jr.:
Ungewöhnliche Abläufe der Sarkoidose.
Pathologisch-anatomische Gesichtspunkte.
Aus: Brecke (Hrsg), Fortbildung in Thoraxerkrankungen
Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1970
130. H. Seeliger, Ch.v. Styp-Rekowski, W. Mall, M. Austen:
Die Sarkoidose in der Bronchus- und Lungenbiopsie.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 64: 309, 1980

131. J. Sehrt, R. Christ:
Das Angiotensin-Umwandlungsenzym
(angiotensin converting enzyme) in der Sarkoidosediagnostik.
Dt. Gesundh.-Wesen, 34: 2414-2416, 1979
132. O. Selroos, C. Grönhagen-Riska:
Angiotensin Converting Enzyme: III Changes in serum level
as an indicator of disease activity in untreated sarcoidosis
Scand. J. Resp. Dis. 60: p. 328-336, 1979
133. W. Siegenthaler:
Differentialdiagnose innerer Krankheiten.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1984
134. L.E. Siltzbach, D.G. James, E. Neville, J. Turiaf,
J.P. Battesti, O.P. Sharma, Y. Hosada, R. Mikawi, M. Odaka:
Course prognosis of sarcoidosis around the world.
Am. J. Med. 57: 847-851, 1974
135. E. Silverstein, J. Friedland, T. Ackermann:
Elevation of granulomatous lymph node and serum lysozyme
in sarcoidosis and correlation with
angiotensin-converting enzyme.
Am. J. Clin. Pathol. 68: 219-224, 1977
136. E. Silverstein, J. Friedland, M. Kitt, H. Lyons:
Increased serum angiotensin converting enzyme in
sarcoidosis.
Isr. J. Med. Sci. 13: 995-999, 1977
137. E. Silverstein, J. Friedland, J.V. Vuletin:
Marked elevation of serum angiotensin-converting enzyme
and hepatic fibrosis containing long-sparing fibrils in
type 2 acute neuronopathie Gaucher's disease
Am. J. Clin. Pathol. 64: 467-471, 1978
138. E. Silverstein, L.P. Pertschuk, J. Friedland:
Immunofluorescent localisation of
angiotensin-converting enzyme in epithelioid and giant cells
of sarcoidosis granulomas.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 76: 6646, 1979
139. L.T. Skeggs, W.H. Marsh, J.R. Kahn, N.P. Shumway:
The existence of two forms of hypertensin.
J. exptl. Med. 99: 275-282, 1954
140. L.T. Skeggs, J.R. Kahn, N.P. Shumway:
Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme
J. Exptl. Med. 103: 295-299, 1956
141. L.T. Skeggs, K.E. Lentz, J.R. Kahn, F.E. Dorer, M. Levine:
Pseudorenin: a new angiotensin-forming enzyme.
Circulat. Res. 25: 451-462, 1969

142. P.G. Squire:
A relationship between the molecular weights of
macromolecules and their elution volumes based on
a model for sephadex gel filtration.
Arch. Biochem. Biophys. 107: 471-478, 1964
143. J. Schaumann:
Sur le lupus pernio.
Mémoire présenté à la Soc. franc. de dermatologie,
Nov. 1914
Norstedt and söner, Stockholm
144. W. Schermuly:
Röntgenologische und szintigraphische Befunde bei
Sarkoidosepatienten.
Der Internist. 23: 325-334, 1982
145. W. Schermuly, W. Sonnentag:
Die Beurteilung der Sarkoidose-Aktivität anhand
röntgenologischer und szintigraphischer Methoden.
Fortschr. Röntgenstr. 136: 49-55, 1982
146. E.G. Schneider, J.O. Davis, J.S. Baumert et al:
The hepatic metabolism of renin and aldosterone:
a review of new observations on the hepatic clearance
of renin.
Circ. Res. 26-27, Suppl. I: 175-183, 1970
147. H. Schweisfurth:
Lokalisation, Charakterisierung und physiologisches
Verhalten des Angiotensin I "Converting Enzyme".
Dissertation, München, 1975.
148. H. Schweisfurth, M. Schmidt, E. Brugger, L. Maiwald, H. Thiel
Alterations of serum carboxypeptidases N and
angiotensin-I-converting enzyme in malignant diseases.
Clin.Biochim. 18: 242-246, 1981
149. H. Schweisfurth:
Persönliche Mitteilung
150. H. Schweisfurth:
Persönliche Mitteilung
151. T.A. Stewart, J.A. Weare, E.G. Erdös:
Purification and characterization of human
converting enzyme (kininase II).
Peptides 2: 145, 1981
152. W. Straub, I. Stempel:
Beitrag zur okulären Sarkoidose.
Adv. Ophthalmol. 36: 245-254, 1978

153. P. Studdy, R. Bird, D.G. James, S. Sherlock:
Serum angiotensin-converting enzyme (SACE) in sarcoidosis
and other granulomatous disorders.
Lancet II: 1331-1334, 1978
154. K. Thureau, J. Schnermann:
Die Natriumkonzentration an den Macula-densa-Zellen
als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat.
Klin. Wschr. 43: 410-413, 1965
155. K. Thureau, J. Schnermann, W. Nagel et al:
Composition of tubular fluid in the macula densa segment
as a factor regulating the function of the
juxtaglomerular apparatus.
Circ. Res. 20-21 (Suppl. II): 79-90, 1967
156. K. Thureau, H. Dahlheim, P. Granger:
On the local formation of angiotensin at the site of
the juxtaglomerular apparatus.
Aus: Proc. 4th Intern. Congr. Nephrol., Stockholm, 1969
157. K. Thureau, H. Dahlheim, A. Grüner, J. Mason, P. Granger:
Activation of renin in the single juxtaglomerular apparatus
by sodium chloride in the tubular fluid of the macula densa.
Circ. Res. 31/II: 182-186, 1972
158. R. Tigerstedt, P.G. Bergman:
Niere und Kreislauf.
Skand. Arch. Physiol. 8: 223-271, 1898
159. P. Tschankova:
Persönliche Mitteilung
160. C.W.G. Turton, E. Grundy, G. Firth, D. Mitchell,
B.G. Ridgen, M. Turner-Warwick:
Value of measuring serum angiotensin I converting enzyme
and lysozyme in the management of sarcoidosis.
Thorax 34: 57-62, 1979
161. E. Ohlinger, K. Wurm:
Skelettsarkoidose - Literaturübersicht und Fallbericht.
Fortschr. Röntgenstr. 125: 111-114, 1976
162. Ventrex-Laboratories:
Antiotensin Converting Enzyme Activity, Radio Assay System.
Ventrex-Laboratories, Summary and explanation of the test.
11/1980
163. R. Vrzić, I. Ivanović, N. Majkić-Singh, S. Spasić:
Diagnostic value of serum angiotensin converting enzyme
activity assay.
Acta Pharm. Jugosl. 35: 181-191, 1985

164. A. Weindl, H. Schweisfurth, M.V. Sofroniew, H. Dahlheim:
Distribution of Converting Enzyme in the rat brain:
high activities in subfornical organ, area postrema
and choroid plexus.
Acta Endocrin. 85 (suppl. 212): 158, 1977
165. E. Werle, I. Trautschold, K. Krammer:
Anreicherung und Immunspezifität des Isorenins der
Glandula submaxillaris der Maus.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349: 1441-1448, 1968
166. J.R. Whitaker:
Determination of molecular weights of proteins by
gel filtration on sephadex.
Anal. Chem. 35: 1950-1953, 1963
167. L.G. Wiman:
Familial occurrence of sarcoidosis.
Proc. Vth Intern. Conf. on Sarcoidosis, Tokyo Press, 1974
168. K. Wurm, H. Reindell, L. Heilmeyer:
Der Lungenboeck im Röntgenbild.
Thieme Verlag, Stuttgart, 1958
169. K. Wurm:
Sarkoidose-Diagnostik.
Dtsch. Med. Wschr. 41: 1356, 1981
170. K. Wurm:
Therapie der Sarkoidose.
Der Internist. 23: 348-355, 1982
171. K. Wurm, R. Gross:
Einführung in einige Probleme der Sarkoidose (M. Boeck).
Der Internist. 23: 297, 1982
172. H.Y.T. Yang, E.G. Erdös, Y. Levin:
A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin
and inactivates bradykinin.
Biochim. Biophys. Acta. 214: 374-376, 1970

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A I	Angiotensin I
A II	Angiotensin II
ACE	Angiotensin I-Converting Enzyme
ACEA	Angiotensin I-Converting Enzyme Aktivität
BPF	Bradykinin Potentiating Factor
EW	Einzelwert
His	Histidin
Leu	Leuzin
MG	Molekulargewicht
MPS	Mononuclear Phagozyte Factor
MW	Mittelwert
Phe	Phenylalanin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RRU	Röntgenreihenuntersuchung
SD	Standardabweichung
VK	Variationskoeffizient
Z-	Benzyloxycarbonyl -

8. LEBENSLAUF

- 24.05.1958 geboren in Hannover; Tochter des Physiologen
Prof.Dr.rer.nat. Herbert Dahlheim und
seiner Frau Brünhild, geb. Berger
- 1965 - 1979 Schulzeit in Hannover und München
- 07.-10.1972 Nantasket Highschool, Boston, U.S.A.
- 27.05.1979 Allgemeine Hochschulreife am Städt.
Berthold-Brecht-Gymnasium, München
- 1979 - 1984 Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-
Universität in München
- 1984/85 Praktisches Jahr:
Chirurgie - Städt. Krankenhaus Neuperlach
Urologie - Städt. Krankenhaus Bogenhausen
Innere Medizin - Klinikum Großhadern, I. Med.
- 04.83-04.86 Doktorarbeit
- 13.11.1985 Approbation als Ärztin, München
- Famulaturen: März-Mai 1982 J.G. Strijdom Hospital,
Johannesburg Südafrika, Innere Medizin
Sept. 1982 Dialyse-Zentrum, Hannover
Sept./Okt. 1982 LVA, München
März und August 1983 Agnes-Karll-Kranken-
haus, Hannover, Chirurgie
- 01.-02.1986 Hospitation an der Universitäts-Augenklinik,
München, Direktor Prof.Dr.med. O.-E. Lund
- ab 01.03.1986 Max-Planck-Institut für klinische und
physiologische Forschung in der Augen-
klinik, München, unter Leitung von
Prof.Dr.med. E. Zrenner

Herrn Professor Dr. med. Günter Fruhmann danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit und insbesondere für die Überlassung des Patientengutes.

Ebenso gilt mein Dank den Herren Prof. Dr. med. K. Thureau, Prof. Dr. med. J. Rosenthal, Universität Ulm, Priv.-Doz. Dr. med. X. Baur und meinem Vater für die vielseitige Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und die nützlichen Diskussionen.

Weiterhin ist Frl. I.M.C. Jacob für die Durchführung eines Teiles der ACE-Aktivitätsbestimmungen, Frau M. Kremp für die sorgfältige Abschrift des Manuskriptes und Herrn Dr. med. H. Schuh für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung zu danken.

Die Untersuchungen wurden außerdem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Max-Planck-Gesellschaft und der Fa. Paesel, Frankfurt/Main unterstützt.

